筑波大学大学院博士課程

数理物質科学研究科博士論文

博士（工学）

不活性化センダイウイルス（HVJ-E）の高分子による機能化とバイオマテリアルへの応用

岡田　孝春

物質・材料工学専攻

第 1 章　緒言

1.1. ヒトとウイルス

現在のヒト・人類にあたるホモ・サピエンス種は、進化の過程で、数十万年～約 12 万年前に東アフリカで誕生した [1]。二足歩行をし、狩猟場を求めて移動した人類は瞬く間に全世界に散らばった。それぞれの地でヒトは、その生活基盤を作ってきたのである。古代文明を経て、地域ごとに国や文明を設立する時代になると、計画的な農耕や狩猟、組織的な軍隊の設立による外敵からの防衛によって、人々の死因は飢えから病気へと移る。病気の原因は、ある種の栄養失調に起因するものや、細菌やバクテリアなどの外来生物の感染によって引き起こされるものがある。ロベルト・コッホにより結核菌やコレラ菌によって、細菌が病気を引き起こすことが観察されると、アレクサンダー・フレミングにより、アオカビからペニシリンが開発された。このペニシリンの開発は、ヒトを長い間苦しめてきた細菌由来の多くの感染症から、ヒトが救われる結果となった。

一方で人類に対し、「ウイルス」は科学技術の発達した現代まで、約 10 万年にも亘って人類の脅威としてあり続けている。紀元前よりその流行が恐れられ、牛痘が開発されるまで人類を苦み続けた天然痘ウイルスや、20 世紀初頭に全世界で約 6 億人が感染し、数千万人を死に至らしめたスペイン風邪の大流行 [2,3] が、その最たる例として挙げられる。科学技術の発達した 21 世紀であっても、後天性免疫不全症候群 (AIDS) を引き起こすエイズウイルス [4–6] やエボラ出血熱をおこすエボラウイルス [7–9] などのウイルス感染症が、多くの人々を苦しめている。加えて、鳥インフルエンザウイルスの突然変異によるパンデミックが全世界的に恐れられていることなど、依然としてウイルスが人類の脅威としてあり続けている。このようなウイルスへの対抗手段として、ウイルスの感染メカニズムの研究や感染予防法の開発など、ヒトとウイルスの生存競争が行われてきた [10–13]。

この「ウイルス」の持つ病原性や増殖能を不活化し、安全性を確保した不活性化ウイルスは、その病気に対する感染予防のためのワクチンとして広く用いられている。更に、ウイルスの有する細胞への感染メカニズムを利用し、遺伝子やタンパク質の目的細胞への運搬ツールとしても利用されている。近年では、再生医療・組織工学への応用に向けた人工多能性幹細胞 [14,15] (iPS 細胞) の作製に、不活性化ウイルスが用いられる例も報告されている。人類の最大の脅威であった「ウイルス」自身が、ヒトの生存に大きく貢献しようとしている。

マウスパラ I 型インフルエンザウイルスであるセンダイウイルス (HVJ) は、世界で初めて細胞融合現象を引き起こすことが確認されたエンベロープ型ウイルスである [16]。この細胞融合現象とは同種・異種問わず、2 個以上の細胞間をウイルスの持つ蛋白質によって接着・融合させる現象、ならびにウイルス自身が 1 個の細胞内へ、エンドサイトーシスを介さずに膜融合を引き起こして侵入する現象である。HVJ はマウスに対する毒性が知られている一方で、人に対しては無毒であることから、2 個以上の細胞の融合によるハイブリドーマの作製により、医学、農学、細胞工学など様々な分野に貢献してきた。1970 年代からは HVJ 内部への遺伝子や薬物の導入によって、細胞内へ内包物を輸送する方法が確立され、遺伝子デリバリーやドラッグデリバリーシステムなどの基礎研究が行われてきた [17,18]。

本論文では、HVJ を不活化した不活性化センダイウイルス [19] (HVJ-E) と呼ばれる不活性化ウイルスと、Layer-by-Layer 法 [20] (LbL 法) により作製された高分子薄膜に着目し、両者の利点を合わせた新規生体材料を創製することで、癌治療、診断、再生医療への貢献を目指した (Figure 1.1) 。

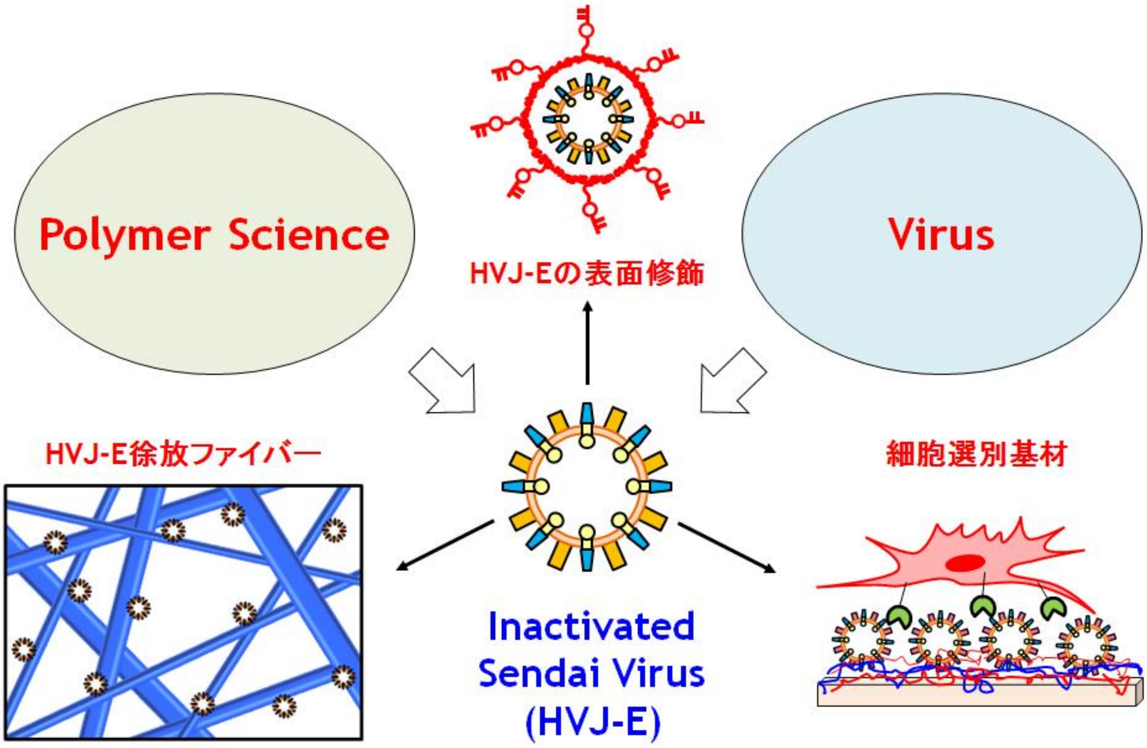

Figure 1.1. 高分子とウイルスを融合した新規生体材料開発に向けた、HVJ-E の表面修飾法、HVJ-E 徐放ナノファイバーおよび細胞選別基材の開発

1.2. 不活性化センダイウイルス（HVJ-E : Hemagglutinating Virus of Japan Envelope）

1.2.1. HVJ-E とは？

HVJ 内部の RNA を UV 照射によって破壊し、マウスに対する病原性や細胞での増殖能を不活化させた不活性化センダイウイルス（HVJ-E : Inactivated HVJ envelope）は 2002 年に Kaneda らによってその作製方法と細胞への遺伝子導入能が報告された（Figure 1.2）[19]。HVJ-E の HVJ 由来のエンベロープ膜上タンパク質である Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) タンパク質と Fusion (F) タンパク質は、ウイルスの RNA 破壊後も活性を維持しており、細胞への膜融合能を有している。またその内部には UV 照射により破壊された RNA 断片が残存した構造となっている。この HVJ-E も前述した HVJ 同様、膜融合能を発現できることから、HVJ-E 内部にプラスミド DNA を導入し、細胞に遺伝子導入を行うなど、バイオ関連研究が盛んに行われてきた [19]。

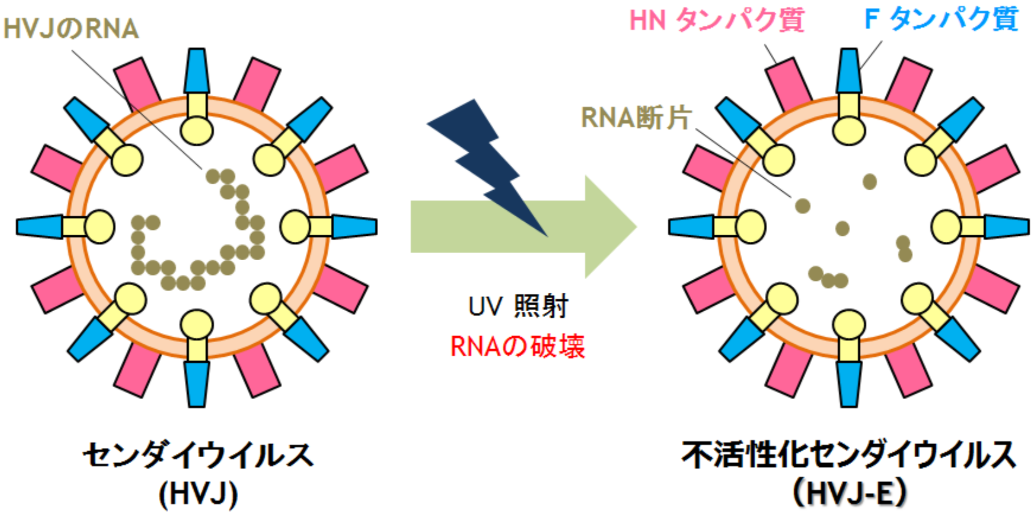

Figure 1.2. 不活性化センダイウイルス (HVJ-E) 作製方法とその構造. HVJ-E は膜表面に Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) タンパク質と Fusion (F) タンパク質を有する [19].

1.2.2. HVJ-E の抗腫瘍効果

2007 年に Kurooka らによって HVJ-E が担癌モデルの癌部位への局部注射により、その腫瘍を劇的に減少させることが初めて報告された (Figure 1.3) [21]。

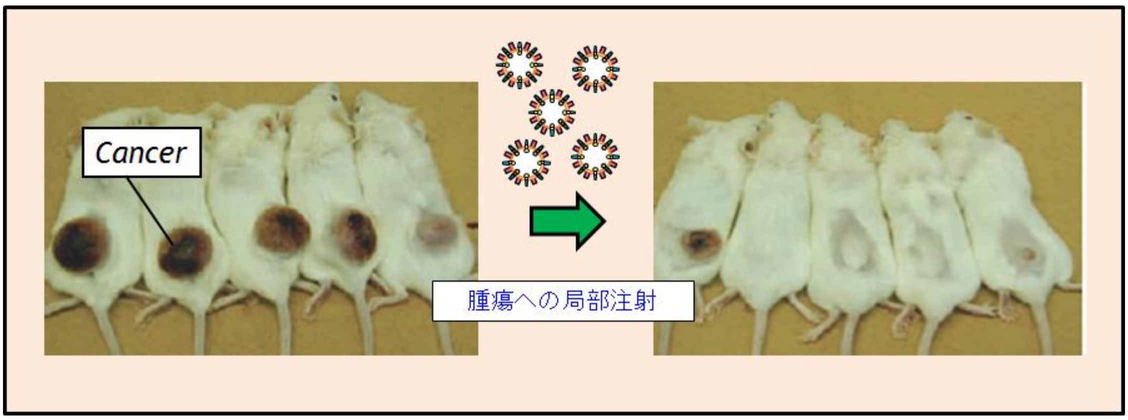

Figure 1.3. 担癌モデルへの HVJ-E の投与とその抗腫瘍効果 [21]. HVJ-E 投与前 (左) と投与後 (右)

HVJ-E は腫瘍組織を移植した動物への投与試験において、腫瘍組織や樹状細胞への感染により、個体に Natural Killer 細胞 (NK 細胞) の活性化、樹状細胞からの Interlaukin-6 (IL-6) の分泌、腫瘍部位における制御性 T 細胞の抑制といった抗腫瘍免疫を誘導し、腫瘍組織を劇的に減少させる性質が見出された [22,23]。つまり、HVJ-E 自身が腫瘍を死滅させるほどの抗腫瘍免疫を誘導できるということである。

更に Kawaguchi らは、HVJ-E の in vitro でのアポトーシス誘導能も報告している [24]。HVJ-E は細胞表面のシアル酸の一種である GD1a を認識して細胞に吸着する。そのため、GD1a の高発現細胞のみが選択的にアポトーシスを誘導することが示された。アポトーシスメカニズムの一種は

Matsushima-Miyagi らによって報告された [25]。HVJ-E 内部の RNA 断片が癌細胞内部の retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) 受容体によって認識される。RIG-I 受容体による RNA 断片認識が細胞の RIG-I / mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) 経路を活性化させ、細胞に tumor necrosis factor related apoptosis ligand (TRAIL) の発現を誘導する。TRAIL が細胞の death domain を有する tumor necrosis factor receptor (TNF-R) と結合すると細胞にアポトーシスが誘導されるため、TRAIL 発現を誘導する細胞の初期融合がアポトーシス誘導のキーファクターとなる [26–28]。

1.2.3. センダイウイルスの利用

・カチオン化ゼラチンコーティングとホウ素捕捉放射線療法への応用

ホウ素捕捉放射線療法 (BNCT : Boron neutron capture therapy) は放射線療法の一種として近年注目されており、癌選択的に放射線をあて、癌を死滅させる方法である [29]。この方法では、ホウ素源となる物質を癌部位に集積させることが重要であり、その方法が課題となっていた。そこで、HVJ-E を利用したホウ素源の癌細胞への導入方法が検討された。

Fujii らは、HVJ-E の内部に Sodium borocaptate (BSH) を導入し、表面をカチオン化ゼラチンで修飾した機能化 HVJ-E を報告している [30]。HVJ-E は細胞と高い融合能を示すため、細胞内部へのホウ素源の高い導入効率が考えられたが、HVJ-E の高い細胞融合性によって、癌部位だけでなく、その他細胞への HVJ-E 感染により BSH 導入効率が下がってしまう。そのため、BSH 内包 HVJ-E 表面をカチオン化ゼラチンで覆うことで、ゼラチンと親和性の高い肝臓へ HVJ-E を集積させ、BNCT による治療効果の増大を実現した。

・IL-12 発現 HVJ-E を用いた癌治療

近年、Saga らによって HVJ-E の遺伝子を改変し、HN タンパク質を発現せず、interleukin - 12 (IL-12) をエンベロープ表面に発現する HVJ-E も開発されている [23] (Figure 1.4) 。IL-12 は p40 と p35 のサブユニットから構成され、interferon-γ (IFN-γ) の発現を細胞に促進させることで抗腫瘍効果を誘導する [31,32]。この性質を利用し、抗腫瘍効果をさらに高めた IL-12 を発現した HVJ-E の開発が報告された。更に HN タンパク質が発現しない HN 欠損 HVJ-E は、細胞への非特異的吸着を抑える性質も同時に兼ね備えている。遺伝子操作によりこのような優れた HVJ-E の作製が報告されている。

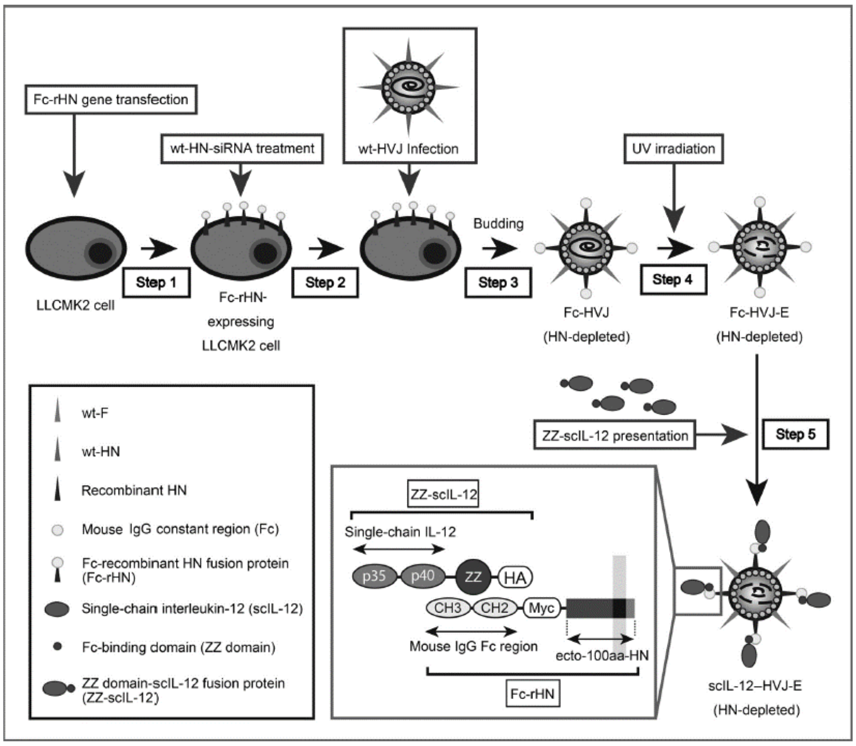

Figure 1.4. Single-chain interleukin-12 (scIL-12) を発現した HVJ-E の作製方法 [23]

・人工多能性幹細胞の作製

HVJ を用いた iPS 細胞 [14,15] の作製方法も報告されている [33–35]。世界で初めて iPS 細胞を報告した Takahashi らは、レトロウイルスを用いた遺伝子組み換えによって iPS 細胞の作製を実現した。一方、癌化やホストゲノムの損傷を避けるため、遺伝子組み換えを行わないプラスミドやアデノウイルス、PiggyBac やタンパク質の導入で作製する方法も報告されている [36–40]。しかしそれらの方法では、iPS 細胞の作製効率が悪いといった欠点があった。HVJ はその特徴として、細胞膜に対する高い融合能を発現する。更に、HVJ のゲノムは細胞質で転写・翻訳が行われることから、ホストゲノムに対する傷害性を有さない。そのため、iPS 細胞の誘導に優れたウイルスベクターとして期待されている。

1.2.4. HVJ-E の長所と短所

前述した通り、HVJ-E は優れた遺伝子導入能、細胞融合能を有し、癌に対する抗腫瘍免疫を誘導し、癌の死滅のほか、抗癌剤との併用で抗癌作用の向上が期待できる [41]。加えて、特定の糖鎖を認識し、捕捉できる吸着能を有する。一方、HVJ-E はその高い細胞認識能・融合能から、所定時間、癌部位に蓄積することが出来ない。加えて、癌細胞に対する標的能を有さない為、血液中の赤血球と容易に結合し、溶血反応を引き起こす。つまり、これらの長所を伸ばし、短所をなくすための HVJ-E の機能化が求められている。そこで本論文では、高分子化学と HVJ-E (ウイルス) を組み合わせた新規生体材料を創製することを目指し、３種類の新規生体材料、ヒアルロン酸修飾 HVJ-E、HVJ-E 徐放ナノファイバー、HVJ-E 固定化細胞分離基材を提案した (Figure 1.1) 。

上述した新規生体材料を開発するにあたり、本論文では Layer-by-Layer 法 (LbL 法) とよばれる高分子積層法を利用し、HVJ-E の機能化を実現した。

1.3. Layer-by-Layer 法（LbL 法）

1.3.1. Layer-by-Layer 法（LbL 法）とは？

LbL 法は 1997 年に Decher によって報告された高分子積層化によるナノ薄膜形成技術である [20] (Figure 1.5) 。カチオン性高分子とアニオン性高分子の溶液に基板を交互に浸漬させることで、静電相互作用を駆動力とした積層膜が作製できる。この方法は架橋剤や Langmuir-Blodgett 膜作製に用いるような特殊な装置を必要としないため、様々な材料表面で利用されてきた [42–47]。

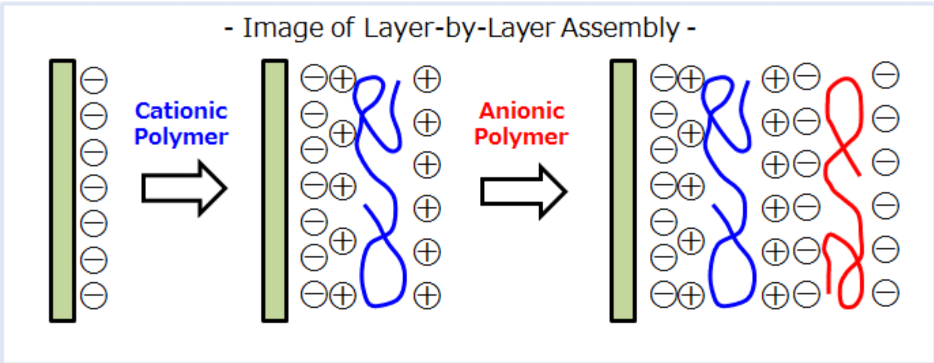

Figure 1.5. Layer-by-Layer 法 (LbL 法) の概念図 [20]

高分子の組み合わせは多岐にわたり、poly allylamine hydrochloride 、polystyrene sulfonate、poly dimethyldiallylammonium chloride などの合成高分子だけではなく、chitosan (CH) や poly-L-lysine (PLL) 、algnic acid (ALG) 、hyaluronic acid (HA) などの生体適合性・生分解性高分子でも膜の作製が可能である。架橋剤などを用いずに、生体適合性高分子の表面修飾が可能であることから、医療材料・生物材料の表面修飾に本技術が期待されている。

1.3.2. Layer-by-Layer 法（LbL 法）の応用

LbL 法は架橋剤などを用いず、生分解性高分子を利用できることから、生体との界面をつかさどる機能性界面修飾法として期待されている。以下にこれまで報告されている応用例等を示す。

・<u>薬物輸送やイメージングへの応用</u>

Poon らは、金ナノ粒子表面を PLL、HA および dextran で修飾した約 50 nm のイメージング用ナノ粒子を報告している [48] (Figure 1.6 a, b) 。金ナノ粒子は近赤外光で検出可能であることから、生体内のイメージングに近年用いられている。直径が約 200 nm 以下の粒子は血液を循環し、癌組織近

傍に Enhanced Permeability and Retention 効果 (EPR 効果)[49] で蓄積することが知られており、この性質を利用して癌部位に粒子が蓄積される (Figure 1.6 c)。その後、対外から近赤外光を照射することで癌部位の検出が可能である。

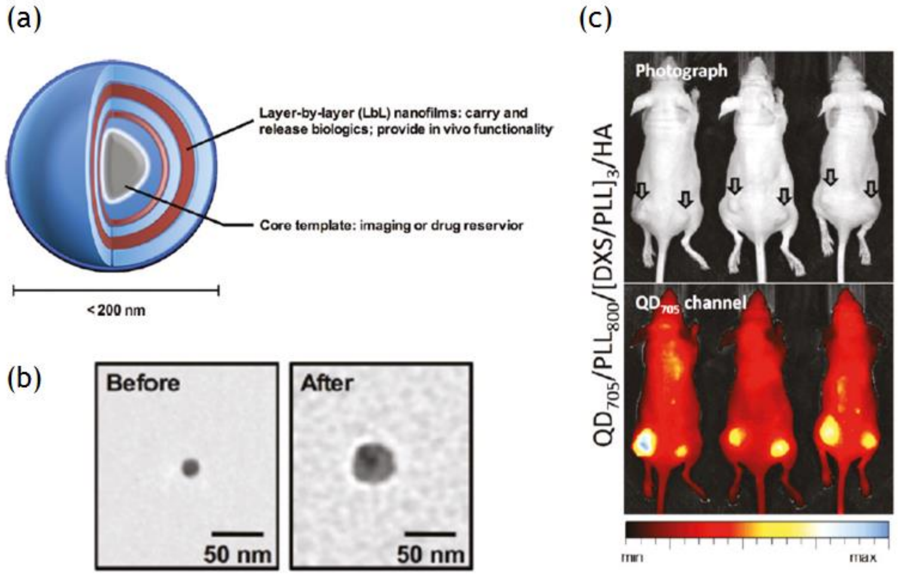

Figure 1.6. (a) LbL 法による金ナノ粒子のコーティングによるイメージングと薬物導入の概念図 (b) 金ナノ粒子のコーティング前後の TEM 画像 (c) 担癌マウスへの投与と癌部位選択的な蓄積[48]

このようなナノ粒子表面の修飾や、LbL 膜で抗癌剤や薬物をコーティングする技術を用いて、癌のイメージングや薬物輸送を行う技術が多数報告されている[42,50–53]。

・組織工学への応用

Matsusaki らは、LbL 法を利用し、細胞の多層積層化技術を開発した (Figure 1.7)[54]。Extra cellular matrix (ECM) の主要構成成分である fibronectin (FN) と gelatin を培養細胞上に LbL コーティングし、その LbL 膜表面に新たな細胞を播種することで、細胞が細胞上に吸着することが可能となり、細胞の多層積層化を実現した。近年ではその技術を発展させ、固定細胞ではなく分散状態で細胞表面に LbL コーティングを行い、細胞の濃度をコントロールすること、内皮細胞を導入することで、組織の血管形成モデルの作製なども報告している[55–57]。

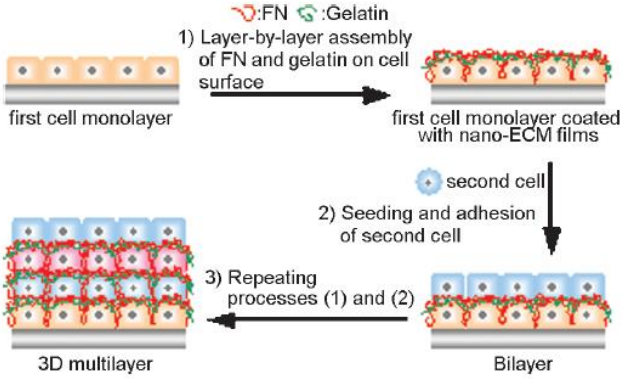

Figure 1.7. LbL 法を用いた細胞積層技術の概念図[54]。1) 細胞を単層に培養し、細胞上に FN と gelatin の LbL 修飾を行う, 2) 多層積層させたい細胞を LbL 膜上に播種し、吸着させる, 3) 1)および 2) を繰り返し行い、細胞を積層化

・インプラントの表面修飾

従来の金属インプラントは、金属をそのまま骨に埋め込み、治療へと利用されてきた。しかし、インプラントと骨の界面の接着が悪く、症状が改善しないことが課題であった。そこで Picart らは、bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) を固定化した骨再生誘導能を有するインプラントを提案している (Figure 1.8)[58]。チタンから作製されたインプラントの表面に PLL と HA からなる LbL 膜を作製し、その LbL 膜の最表面に BMP-2 を固定化した。BMP-2 は筋芽細胞に対し骨分化を誘導する作用を有していることから、BMP-2 固定化インプラントを移植することで、骨再生を誘導可能なインプラントの作製を期待した。固定化された BMP-2 は表面に固定化後も活性を維持しており、マウスへの埋め込み試験では、従来品と比較し、すぐれた骨再生誘導能を示した。

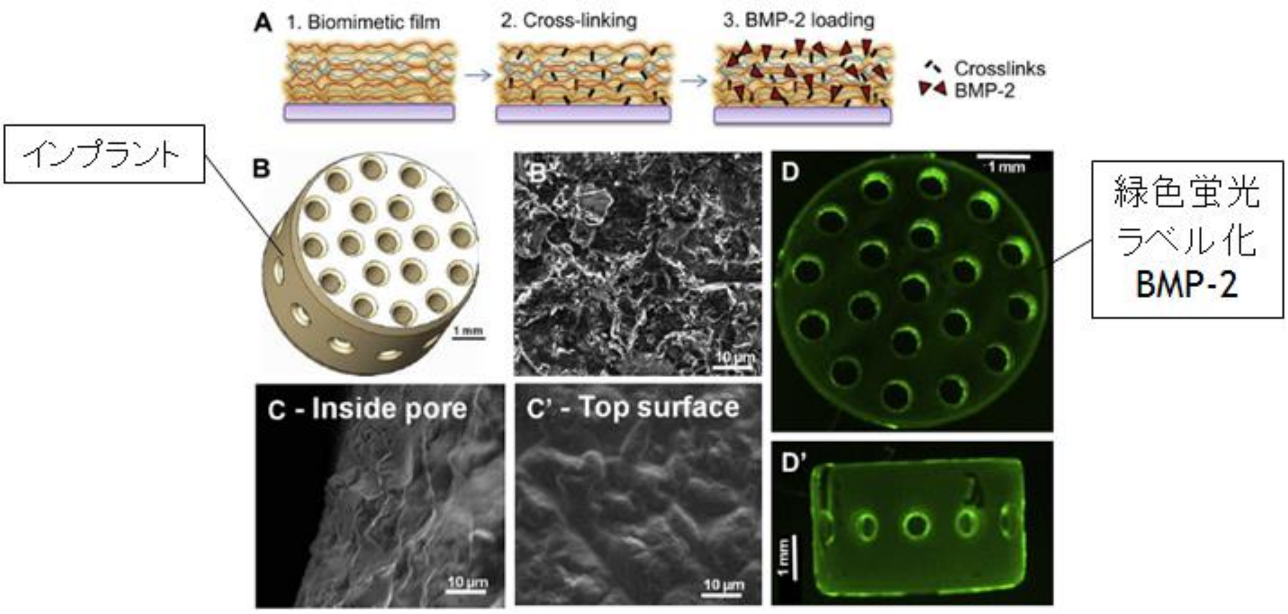

Figure 1.8. (A) インプラント表面の Layer-by-Layer 膜の (1) 修飾と (2) 架橋, (3) BMP-2 の担持の概念図. (B) 内孔を有するインプラント概念図. (B') インプラント表面の SEM 画像. BMP-2 修飾後の (C) 内孔表面と (C') 表面の SEM 画像および FITC ラベル化 BMP-2 修飾後の基板の蛍光顕微鏡観察における インプラントの (D) 上面と (D') 側面 [58].

・生体材料の表面修飾

ヒトの赤血球は、他血液型の血液と混ざると凝集反応を起こし、それが献血等の制約となっている。主な要因として、赤血球表面に存在する抗原が挙げられる。震災などの非常時における血液不足を解消する一つの提案として、Mansouri らは、ヒト赤血球表面に CH と ALG から形成される LbL 膜を作製した赤血球を提案している (Figure 1.9) [59]。本技術では、LbL 法により赤血球表面にナノ薄膜を作製し、抗原を薄膜で覆うことで、他血液型の血液でも輸血を可能とする技術を提案している。この技術により作製された赤血球は、免疫応答性を損失させる一方、酸素の保持は可能となっており、将来的には血液不足などに対応できるようになるかもしれない。

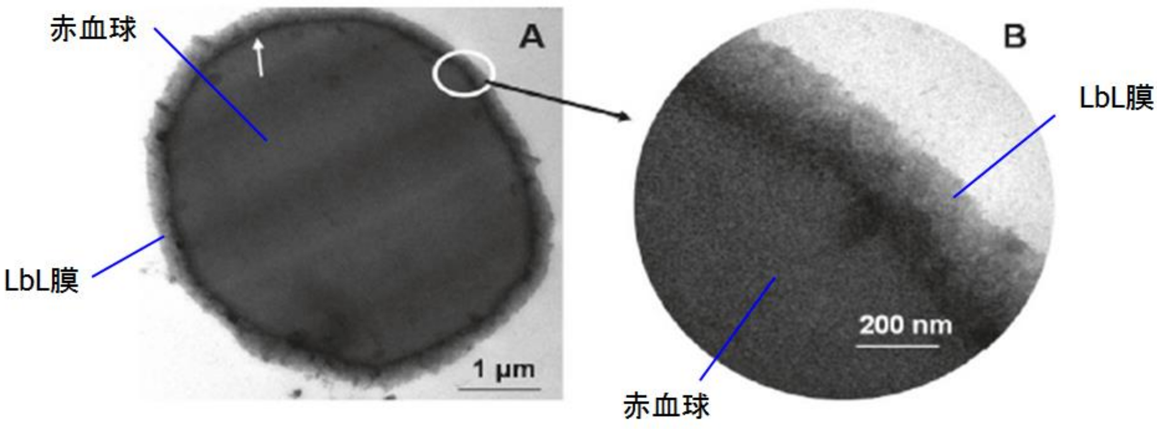

Figure 1.9. LbL 修飾した赤血球の TEM 画像 [59]

1.4. 本論文の主題と構成

LbL 法の生体材料表面への応用事例が示す通り、LbL の技術は近年、生理活性物質や生体材料、細胞などの活性を保持したまま、更に機能化させるために盛んに用いられてきた。この LbL 法を用いることで、HVJ-E の活性を維持したままの表面修飾により①HVJ-E の抗腫瘍活性を高め、非特異的な吸着を抑える、②所定時間癌部位に保持・徐放する、③GD1a 捕捉能を活かした細胞分離を実現したので、本論文にて報告する（Figure 1.10）。

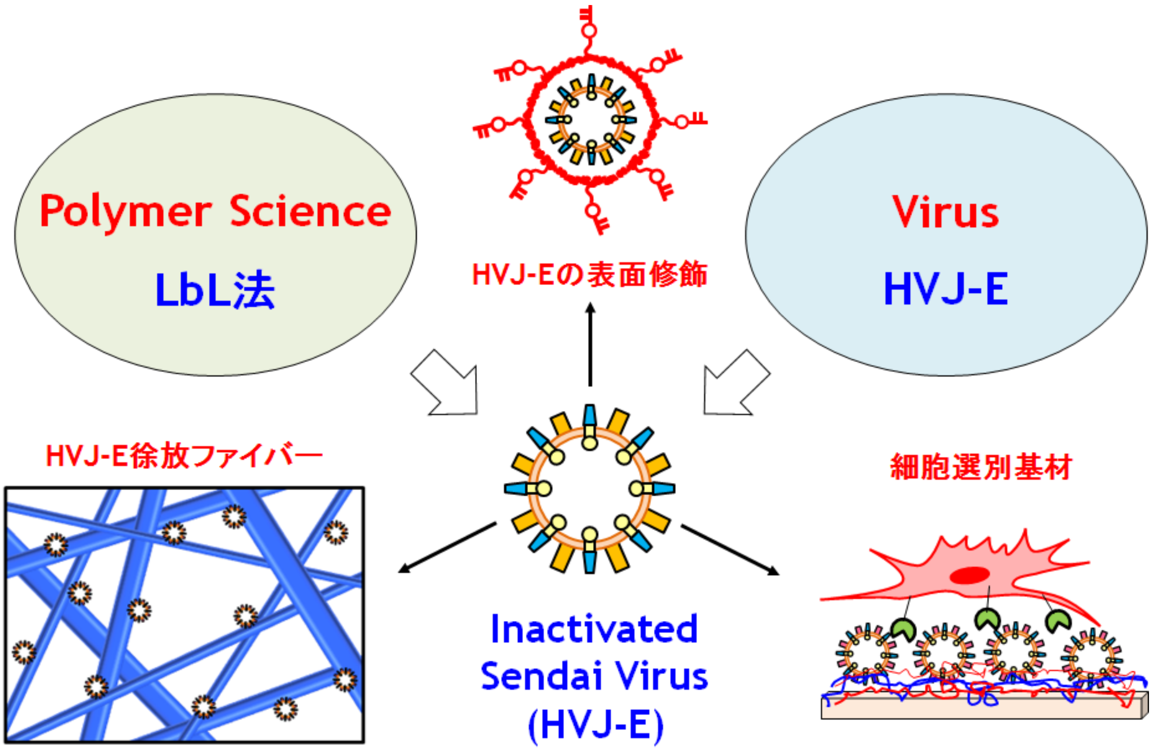

Figure 1.10. HVJ-E の LbL 法を用いた機能化と生体材料への応用

本論文は全 5 章から構成され、高分子を用いた修飾により HVJ-E の機能化、ならびにバイオマテリアルへの応用に向けて得られた知見をまとめた。その成果を下記にまとめる。

第 1 章では、本研究の背景および研究目的を述べた。

第 2 章では、HVJ-E のエンベロープ表面に LbL 法を用いて、HA を修飾するための基礎技術開発について報告した。HA の表面修飾は腫瘍細胞表面に過剰発現する CD44 レセプターへの標的能の付与に寄与すると考えられる。また、高分子の修飾によって赤血球に対する溶血能を減少させることに成功した。この基礎技術の開発は、HVJ-E の優れた機能を積極的に利用するために必要不可欠な技術となりえる。

第 3 章では、HVJ-E を表面に固定化、および生体内で所定時間徐放可能なナノファイバーの開発について報告した。HVJ-E は単独で癌細胞に細胞死を誘導する能力があり、この HVJ-E を局所で所定時間放出させることで、抗腫瘍効果を高めることが可能となる。LbL 法により作製した HVJ-E 徐

放ファイバーは、癌細胞の成長を 72 時間抑制しただけでなく、細胞数を減少させることも確認した。この結果から、HVJ-E 徐放ファイバーの有用性が示された。この基礎技術は、ファイバー内部への磁性粒子や抗癌剤の封入により、化学療法・温熱療法と免疫療法を組み合わせた革新的な治療法の開発に不可欠な技術となりえる。

第 4 章では、HVJ-E を用いた細胞分離方法の開発について報告した。HVJ-E の GD1a 選択的な吸着能を利用し、表面に固定化させた HVJ-E が GD1a 発現細胞を優位に吸着させることを見出した。この技術は、再生医療におけるヒト骨髄由来間葉系肝細胞の細胞分離や、GD1a を発現する癌細胞の単離に利用可能である。

第 5 章では、本論文で得られた学術的知見を総括し、今後の展望としてまとめた。

1.5. 参考文献

(1) Stringer, C. Human Evolution: Out of Ethiopia. *Nature* **2003**, *423*, 692–693.

(2) Frost, W. Statisties of Influenza Morbidity. *Public Health Rep.* **1920**, *35*, 584–597.

(3) Kobasa, D.; Jones, S. M.; Shinya, K.; Kash, J. C.; Copps, J.; Ebihara, H.; Hatta, Y.; Kim, J. H.; Halfmann, P.; Hatta, M.; et al. Aberrant Innate Immune Response in Lethal Infection of Macaques with the 1918 Influenza Virus. *Nature* **2007**, *445*, 319–323.

(4) Cullen, B. R. Trans-Activation of Human Immunodeficiency Virus Occurs via a Bimodal Mechanism. *Cell* **1986**, *46*, 973–982.

(5) Fauci, A. S. The Human Immunodeficiency Virus: Infectivity and Mechanisms of Pathogenesis. *Science* **1988**, *239*, 617–622.

(6) Phillips, D. M.; Bourinbaiar, A. S. Mechanism of HIV Spread from Lymphocytes to Epithelia. *Virology* **1992**, *186*, 261–273.

(7) Leroy, E. M.; Kumulungui, B.; Pourrut, X.; Rouquet, P.; Hassanin, A.; Yaba, P.; Délicat, A.; Paweska, J. T.; Gonzalez, J.-P.; Swanepoel, R. Fruit Bats as Reservoirs of Ebola Virus. *Nature* **2005**, *438*, 575–576.

(8) Towner, J. S.; Sealy, T. K.; Khristova, M. L.; Albarino, C. G.; Conlan, S.; Reeder, S. A.; Quan, P. L.; Lipkin, W. I.; Downing, R.; Tappero, J. W.; et al. Newly Discovered Ebola Virus Associated with Hemorrhagic Fever Outbreak in Uganda. *PLoS Pathog* **2008**, *4*, e1000212.

(9) Ebola Response Team, W. Ebola Virus Disease in West Africa — The First 9 Months of the Epidemic and Forward Projections. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1481–1495.

(10) Hatta, M.; Gao, P.; Halfmann, P.; Kawaoka, Y. Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses. *Science* **2001**, *293*, 1840–1842.

(11) Lindesmith, L. C.; Donaldson, E. F.; LoBue, A. D.; Cannon, J. L.; Zheng, D.-P.; Vinje, J.; Baric, R. S. Mechanisms of GII.4 Norovirus Persistence in Human Populations. *PLoS Med.* **2008**, *5*, e31.

(12) Neumann, G.; Noda, T.; Kawaoka, Y. Emergence and Pandemic Potential of Swine-Origin H1N1 Influenza Virus. *Nature* **2009**, *459*, 931–939.

(13) Imai, M.; Watanabe, T.; Hatta, M.; Das, S. C.; Ozawa, M.; Shinya, K.; Zhong, G.; Hanson, A.; Katsura, H.; Watanabe, S.; et al. Experimental Adaptation of an Influenza H5 HA Confers Respiratory Droplet Transmission to a Reassortant H5 HA/H1N1 Virus in Ferrets. *Nature* **2012**, *486*, 420–428.

(14) Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872.

(15) Yu, J.; Yu, J.; Vodyanik, M. A.; Smuga-otto, K.; Antosiewicz-bourget, J.; Frane, J. L.; Tian, S.; Nie, J.; Jonsdottir, G. A.; Ruotti, V.; et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human

Somatic Cells. *Science* **2007**, *318*, 1917–1920.

(16) Okada, Y. Interaction between Influenza Virus and Ehrlich's Tumor Cells. III. Fusion Phenomenon of Ehrlich's Tumor Cells by the Action of HVJ Z Strain. *Med. J. Osaka Univ.* **1957**, 709–717.

(17) Furusawa, M.; Toshikazu, N.; Yamaizumi, M.; Okada, Y. Injection of Foreign Substances into Single Cells by Cell Fusion. *Nature* **1974**, *249*, 449–450.

(18) Okada, Y.; Kim, J.; Maeda, Y.; Koseki, I. Specific Movement of Cell Membranes Fused with HVJ (Sendai Virus). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1974**, *71*, 2043–2047.

(19) Kaneda, Y.; Nakajima, T.; Nishikawa, T.; Yamamoto, S.; Ikegami, H.; Suzuki, N.; Nakamura, H.; Morishita, R.; Kotani, H. Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) Envelope Vector as a Versatile Gene Delivery System. *Mol. Ther.* **2002**, *6*, 219–226.

(20) Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232–1237.

(21) Kurooka, M.; Kaneda, Y. Inactivated Sendai Virus Particles Eradicate Tumors by Inducing Immune Responses through Blocking Regulatory T Cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 227–236.

(22) Suzuki, H.; Kurooka, M.; Hiroaki, Y.; Fujiyoshi, Y.; Kaneda, Y. Sendai Virus F Glycoprotein Induces IL-6 Production in Dendritic Cells in a Fusion-Independent Manner. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 1325–1329.

(23) Saga, K.; Tamai, K.; Yamazaki, T.; Kaneda, Y. Systemic Administration of a Novel Immune-Stimulatory Pseudovirion Suppresses Lung Metastatic Melanoma by Regionally Enhancing IFN-γ Production. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 668–679.

(24) Kawaguchi, Y.; Miyamoto, Y.; Inoue, T.; Kaneda, Y. Efficient Eradication of Hormone-Resistant Human Prostate Cancers by Inactivated Sendai Virus Particle. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2478–2487.

(25) Matsushima-Miyagi, T.; Hatano, K.; Nomura, M.; Li-Wen, L.; Nishikawa, T.; Saga, K.; Shimbo, T.; Kaneda, Y. TRAIL and Noxa Are Selectively Upregulated in Prostate Cancer Cells Downstream of the RIG-I/MAVS Signaling Pathway by Nonreplicating Sendai Virus Particles. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 6271–6283.

(26) Thomas, W. D.; Hersey, P. TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Induces Apoptosis in Fas Ligand-Resistant Melanoma Cells and Mediates CD4 T Cell Killing of Target Cells. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 2195–2200.

(27) Zhang, X. D.; Franco, A.; Myers, K.; Gray, C.; Nguyen, T.; Hersey, P. Relation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Receptor and FLICE-Inhibitory Protein Expression to TRAIL-Induced Apoptosis of Melanoma Relation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Receptor and FLICE- Inhibitory Protein Expressi. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2747–2753.

(28) Wang, S.; El-Deiry, W. S. TRAIL and Apoptosis Induction by TNF-Family Death Receptors. *Oncogene* **2003**, *22*, 8628–8633.

(29) Yamamoto, T.; Nakai, K.; Matsumura, A. Boron Neutron Capture Therapy for Glioblastoma. *Cancer*

Lett. **2008**, *262*, 143–152.

(30) Fujii, H.; Matsuyama, A.; Komoda, H.; Sasai, M.; Suzuki, M.; Asano, T.; Doki, Y.; Kirihata, M.; Ono, K.; Tabata, Y.; et al. Cationized Gelatin-HVJ Envelope with Sodium Borocaptate Improved the BNCT Efficacy for Liver Tumors in Vivo. *Radiat. Oncol.* **2011**, *6*, 8.

(31) Colombo, M. P.; Trinchieri, G. Interleukin-12 in Anti-Tumor Immunity and Immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2002**, *13*, 155–168.

(32) Watford, W. T.; Moriguchi, M.; Morinobu, A.; O'Shea, J. J. The Biology of IL-12: Coordinating Innate and Adaptive Immune Responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2003**, *14*, 361–368.

(33) Ban, H.; Nishishita, N.; Fusaki, N.; Tabata, T.; Saeki, K.; Shikamura, M.; Takada, N.; Inoue, M.; Hasegawa, M.; Kawamata, S.; et al. Efficient Generation of Transgene-Free Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) by Temperature-Sensitive Sendai Virus Vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 14234–14239.

(34) Fujie, Y.; Fusaki, N.; Katayama, T.; Hamasaki, M.; Soejima, Y.; Soga, M.; Ban, H.; Hasegawa, M.; Yamashita, S.; Kimura, S.; et al. New Type of Sendai Virus Vector Provides Transgene-Free iPS Cells Derived from Chimpanzee Blood. *PLoS One* **2014**, *9*, e113052.

(35) Fusaki, N.; Ban, H.; Nishiyama, A.; Saeki, K.; Hasegawa, M. Efficient Induction of Transgene-Free Human Pluripotent Stem Cells Using a Vector Based on Sendai Virus, an RNA Virus That Does Not Integrate into the Host Genome. *Proc. Japan Acad. Ser. B.* **2009**, *85*, 348–362.

(36) Okita, K.; Nakagawa, M.; Hyenjong, H.; Ichisaka, T.; Yamanaka, S. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells without Viral Vectors. *Science* **2008**, *322*, 949–953.

(37) Zhou, H.; Wu, S.; Joo, J. Y.; Zhu, S.; Han, D. W.; Lin, T.; Trauger, S.; Bien, G.; Yao, S.; Zhu, Y.; et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 381–384.

(38) Stadtfeld, M.; Nagaya, M.; Utikal, J.; Weir, G.; Hochedlinger, K. Induced Pluripotent Stem Cells Generated without Viral Integration. *Science* **2008**, *322*, 945–949.

(39) Yu, J.; Hu, K.; Smuga-Otto, K.; Tian, S.; Stewart, R.; Slukvin, I. I.; Thomson, J. a. Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science* **2009**, *324*, 797–801.

(40) Woltjen, K.; Michael, I. P.; Mohseni, P.; Desai, R.; Mileikovsky, M.; Hämäläinen, R.; Cowling, R.; Wang, W.; Liu, P.; Gertsenstein, M.; et al. piggyBac Transposition Reprograms Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *Nature* **2009**, *458*, 766–770.

(41) Kawano, H.; Komaba, S.; Kanamori, T.; Kaneda, Y. A New Therapy for Highly Effective Tumor Eradication Using HVJ-E Combined with Chemotherapy. *BMC Med.* **2007**, *5*, 28. doi:10.1186/1741-7015-5-28

(42) Caruso, F.; Trau, D.; Möhwald, H.; Renneberg, R. Enzyme Encapsulation in Layer-by-Layer Engineered Polymer Multilayer Capsules. *Langmuir* **2000**, *16*, 1485–1488.

(43) Hammond, P. T. Form and Function in Multilayer Assembly: New Applications at the Nanoscale. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1271–1293.

(44) Jiang, C.; Tsukruk, V. V. Freestanding Nanostructures via Layer-by-Layer Assembly. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 829–840.

(45) Kang, E.; Bu, T.; Jin, P.; Sun, J.; Yang, Y. Layer-by-Layer Deposited Organic / Inorganic Hybrid Multilayer Films Containing Noncentrosymmetrically Orientated Azobenzene Chromophores. *Langmuir* **2007**, *23*, 7594–7601.

(46) Kim, J. H.; Hwang, J. H.; Lim, T. Y. A Layer-by-Layer Self-Assembly Method for Organic-Inorganic Hybrid Multilayer Thin Films. *J. Ceram. Process. Res.* **2009**, *10*, 770–773.

(47) Sood, A.; Sundberg, P.; Malm, J.; Karppinen, M. Layer-by-Layer Deposition of Ti-4,4’-Oxydianiline Hybrid Thin Films. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 6435–6439.

(48) Poon, Z.; Lee, J. B.; Morton, S. W.; Hammond, P. T. Controlling in Vivo Stability and Biodistribution in Electrostatically Assembled Nanoparticles for Systemic Delivery. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 2096–2103.

(49) Maeda, H. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41*, 189–207.

(50) Macdonald, M. L.; Samuel, R. E.; Shah, N. J.; Padera, R. F.; Beben, Y. M.; Hammond, P. T. Tissue Integration of Growth Factor-Eluting Layer-by-Layer Polyelectrolyte Multilayer Coated Implants. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1446–1453.

(51) Zhu, X.; Zhou, D.; Jin, Y.; Song, Y.; Zhang, Z.; Huang, Y. A Novel Microsphere with a Three-Layer Structure for Duodenum-Specific Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2011**, *413*, 110–118.

(52) Ariga, K.; Lvov, Y. M.; Kawakami, K.; Ji, Q.; Hill, J. P. Layer-by-Layer Self-Assembled Shells for Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 762–771.

(53) Guo, X. M.; Guo, B.; Zhang, Q.; Sun, X. Absorption of 10-Hydroxycamptothecin on Fe3O4 Magnetite Nanoparticles with Layer-by-Layer Self-Assembly and Drug Release Response. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 3039–3046.

(54) Matsusaki, M.; Kadowaki, K.; Nakahara, Y.; Akashi, M. Fabrication of Cellular Multilayers with Nanometer-Sized Extracellular Matrix Films. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4689–4692.

(55) Nishiguchi, A.; Yoshida, H.; Matsusaki, M.; Akashi, M. Rapid Construction of Three-Dimensional Multilayered Tissues with Endothelial Tube Networks by the Cell-Accumulation Technique. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 3506–3510.

(56) Asano, Y.; Shimoda, H.; Okano, D.; Matsusaki, M.; Akashi, M. Transplantation of Three-Dimensional Artificial Human Vascular Tissues Fabricated Using an Extracellular Matrix Nanofilm-Based Cell-Accumulation Technique. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2015**, n/a – n/a.

(57) Nishiguchi, A.; Matsusaki, M.; Akashi, M. Structural and Viscoelastic Properties of Layer-by-Layer Extracellular Matrix (ECM) Nanofilms and Their Interactions with Living Cells. *ACS Biomater. Sci.*

Eng. **2015**, *1*, 816–824.

(58) Guillot, R.; Gilde, F.; Becquart, P.; Sailhan, F.; Lapeyrere, A.; Logeart-Avramoglou, D.; Picart, C. The Stability of BMP Loaded Polyelectrolyte Multilayer Coatings on Titanium. *Biomaterials* **2013**, *34*, 5737–5746.

(59) Mansouri, S.; Merhi, Y.; Winnik, F. M.; Tabrizian, M. Investigation of Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolytes on Fully Functional Human Red Blood Cells in Suspension for Attenuated Immune Response. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 585–592.

第 2 章

HVJ-E 上への高分子修飾法の確立とその機能

2.1. 緒言

2.1.1 ウイルスやナノ粒子の表面修飾

細胞やウイルス、バクテリアなどと生理活性物質、合成高分子を化学的に修飾し、新たな機能を付与する研究はこれまで盛んに行われている。加えて近年、ナノスケールの高分子層を表面に修飾することにより、ナノサイズ粒子の機能化が行われている。この修飾により、ナノ粒子にイメージングや、免疫回避能の付与、或いは、生体内での薬物・タンパク質活性保持が行われている [1–6]。

また近年、ウイルス様の粒子を作製し、癌細胞に効率的に抗癌剤のデリバリーを行う方法も考案されている [7]。遺伝子デリバリーの分野においては、アデノウイルス由来のウイルスベクターが、先天的な遺伝子病治療のための効率的な遺伝子導入方法として提案されている [8]。また、アデノウイルスベクターのカプシド表面へ poly[N-(2- hydroxypropyl)methacrylamide] (PHPMA) の共重合体を化学修飾し、ウイルスが血中抗体により認識されることを完全に防ぐ研究も報告されている [9]。更に、表面への fibroblast growth factor-2 (FGF-2) を poly-(ethylene glycol) (PEG) を介して修飾し、アデノウイルスのレセプター非依存的な遺伝子デリバリーも実現されている [10]。PEG による表面修飾は、生体内における薬物の血中滞留性を向上させ、抗体による認識を阻害するものとして知られている [11]。加えて、PEG による表面修飾により、アデノウイルス以外のウイルスにおいても、血中での滞留性や遺伝子の発現時間の延長が報告されている [12]。

2.1.2. ナノ粒子の癌部位へのデリバリー

癌治療患者の副作用軽減と効率的な癌治療を目的とした抗癌剤の癌部位へのデリバリー技術の開発においては、主にナノ粒子がそのデリバリー技術に用いられている。例えば高分子の自己組織化により形成される、抗癌剤を内包した高分子ミセルやナノ粒子 [7,13–16] は、大きさが約 100 nm 以下に精密に制御され、静脈注射により、EPR 効果 [17] (粒子サイズ ＜ 200 nm）によって、癌組織の血管間隙部位へ受動的に蓄積される (Figure 2.1)[18] 。この方法により患者の副作用軽減、および従来の抗癌剤の静脈注射と比較し、少ない抗癌剤量での治療が可能となりつつある。

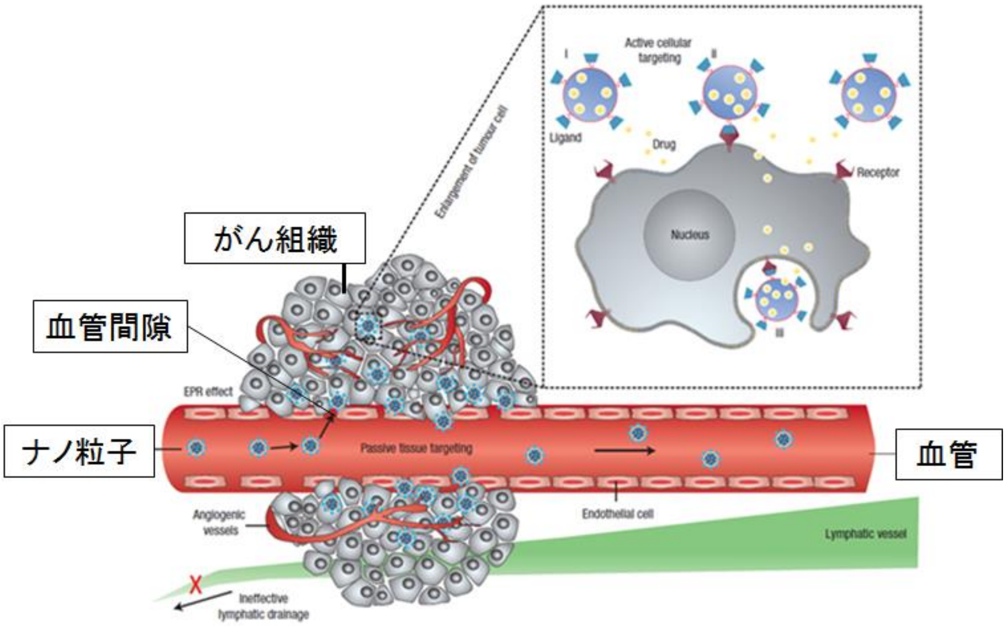

Figure 2.1. ナノ粒子の EPR 効果を利用した癌組織の血管間隙への蓄積 [18]

2.1.3. ヒアルロン酸と癌

N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸から構成されるアニオン性高分子のヒアルロン酸 (HA) は、生体内に広く存在し、細胞外マトリックスの主形成物質であることが知られている (Figure 2.1) 。そのため HA は生体適合性・生体親和性が高く、古くから多くの生体材料へ応用・提案がされてきた [19–22]。

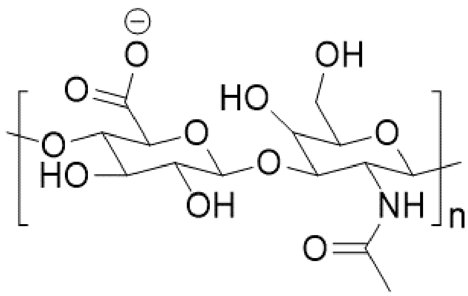

Figure 2.2. ヒアルロン酸 (HA) の構造

一方で、近年、HA が癌細胞の増殖や浸潤に大きく関与していると報告されている [23,24]。これは HA のレセプターである CD44 レセプターが metastatic tumor に多く発現しているからである。Thomas らは、CD44 を発現していないヒトのメラノーマ細胞に、遺伝子導入により CD44 を発現させた場合、その運動性が劇的に向上することを報告している [25]。すなわち、CD44 へのヒアルロン酸の結合が、癌細胞の運動性向上に寄与することを示唆している。一方で CD44 は癌細胞の浸潤を抑える働きがあるとの報告も近年されており、CD44 と癌の浸潤に関する議論が盛んに行われている [26,27]。

このような HA と CD44 の高い親和性を利用し、癌細胞上の CD44 レセプターを標的としたドラ

ッグデリバリーシステムの構築も近年報告されている [28–30]。Eliaz らは、HA にアルキル基を導入し、抗癌剤である doxorubicin を内包したリポソームを作製した [31]。このリポソームは、リポソーム外部にヒアルロン酸を有しており、CD44 レセプターに高い親和性を示し、レセプターを発現する癌細胞に対し、高効率なデリバリーを実現した。

2.2. HVJ-E のヒアルロン酸修飾による癌へのデリバリー

HVJ-E は第 1 章で述べた通り、その高い抗腫瘍効果から、腫瘍免疫治療への応用に期待されている [32]。しかし、HVJ-E の抗腫瘍免疫効果の発現には、HVJ-E の癌細胞への感染、つまり癌組織近傍へのデリバリーが必須となり、その方法が課題となっている。

2.1.2 で述べたように、一般的に粒径が約 200 nm 以下のナノ粒子は、PEG 修飾等によって血管滞留性を増大させ、EPR 効果を利用して、癌組織の血管間隙に粒子を受動的にデリバリーする手法が用いられている。しかし、HVJ-E は、大きさが約 250 nm の粒子であることから、本手法によって癌部位に受動的に蓄積しない (Figure 2.3 a) 。

また HVJ-E は、自身のエンベロープ膜上の HN タンパク質の持つ、高いシアル酸認識能によって、血中でシアル酸を過剰に有する赤血球と容易に結合し、赤血球凝集を引き起こす [34]。更に、GD1a を発現する通常細胞も HVJ-E の癌細胞への吸着を妨げる (Figure 2.3 b) 。

更に、全ての癌細胞が HVJ-E のレセプターである GD1a を発現しておらず、HVJ-E を用いた治療の適応範囲は限定的である [32,33]。

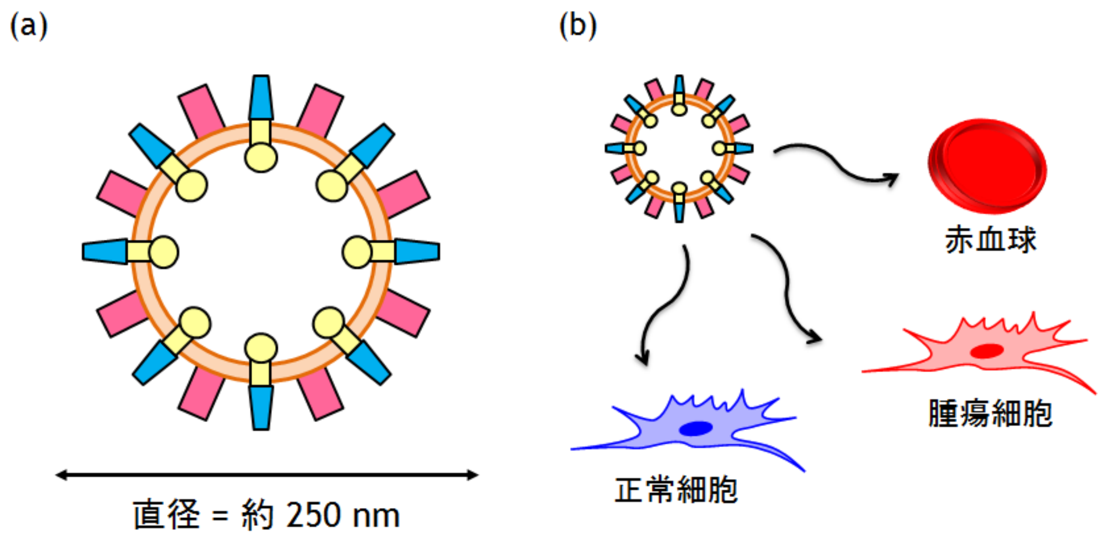

Figure 2.3. HVJ-E を用いた癌治療法の課題. (a) HVJ-E 粒子の直径 (DLS より) [34] と (b) HVJ-E は様々な細胞への吸着

これらの課題から、HVJ-E の赤血球凝集作用や GD1a を発現しない細胞への吸着を低減させ、且つ、癌細胞に対し能動的に集積可能な HVJ-E の機能化が求められていた。HVJ-E の機能化にあたり本論文では、HVJ-E 表面への LbL 法を用いた HA 修飾を実現した (Figure 2.3) 。HA は前述した通り、その高い生体適合性に加え、多くの癌細胞上に過剰発現する CD44 レセプターと高い親和性を有することが知られている。そのため、HVJ-E 表面を HA で修飾することにより、癌細胞への能動

的な標的能付与、および赤血球凝集作用の低減、GD1a を発現しない癌細胞へのデリバリーの実現を期待した。

HVJ-E の膜タンパク質は生体内において樹状細胞からの IL-6 分泌を促進することから、HA 修飾による膜タンパク質の変性は望ましくない。そのため、カルボジイミドなどの架橋剤などを用いずに HA を修飾するため、静電相互作用を用いた修飾方法を検討した。しかし、HVJ-E 表面はアニオン電荷を有し、HA を静電相互作用により直接修飾することはできないため、LbL 法を利用した表面修飾を検討した (Figure 2.4) 。しかしながら、HVJ-E のようなウイルスエンベロープ膜上に、静電相互作用を駆動力とした LbL 法により生体適合性高分子を多層積層した例は過去にない。そこで本研究では、LbL 法を用いてカチオン性高分子を足場とし、HA を HVJ-E 表面に集積する条件の確立を目指した。

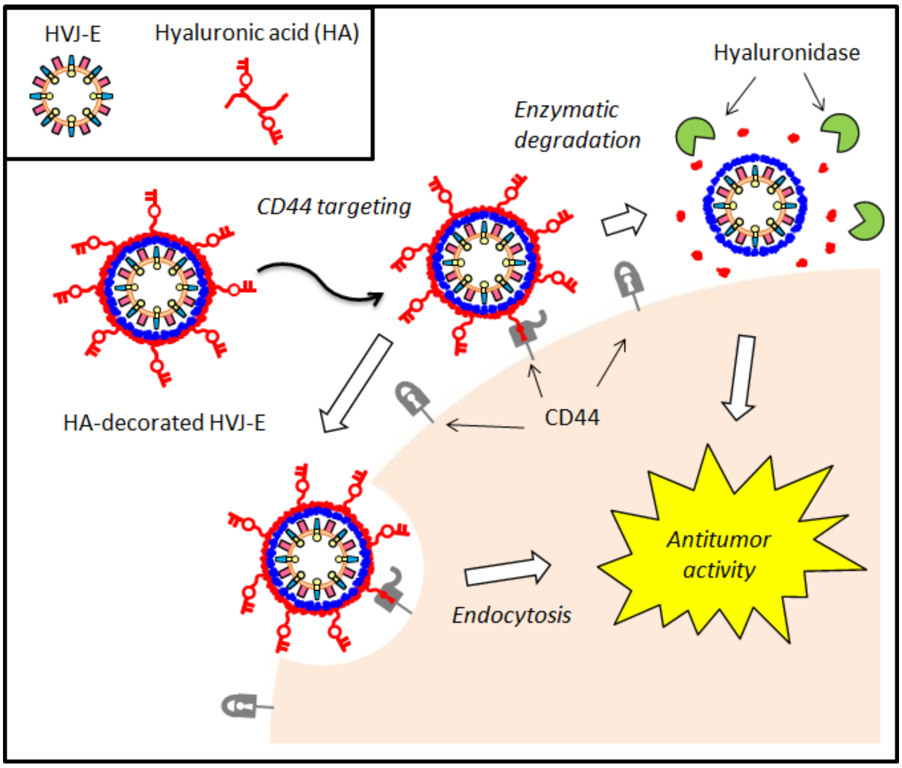

Figure 2.4. HVJ-E 上への HA の LbL 法による表面修飾と癌細胞へのデリバリー[34]

2.3. 実験

2.3.1. 本実験の概要

HVJ-E のエンベロープ膜表面をカチオン性高分子であるグリコールキトサン (GC: glycol chitosan), キトサン (CH: chitosan) , ポリ-L-リシン (PLL: poly-L-lysine) とヒアルロン酸 (HA: hyaluronic acid) を利用した LbL 法により、HVJ-E 上へのヒアルロン酸修飾条件を検討した。LbL の条件探索を行い、GC と HA の高分子の組み合わせのみ高分子集積後の HVJ-E の凝集を生じなかったため、GC と HA を利用した LbL 膜の多層積層を行った。LbL 修飾後の粒子を透過型電子顕微鏡により評価した。HVJ-E 上の HA の酵素分解反応をヒアルロン酸分解酵素による分解試験により評価した。最後に、LbL 修飾 HVJ-E の LbL 膜の pH 耐性の評価、赤血球凝集作用の検討を行った。

2. 3. 2.　Layer-by-Layer 法を用いた高分子の修飾方法

はじめに、カチオン性高分子である GC, CH, PLL とアニオン性高分子である HA を、それぞれ Dulbecco's phosphate buffer (PBS) に溶解した高分子溶液を作製した (Figure 2.5) 。0.1 M の塩酸および 0.1 M の水酸化ナトリウム水溶液を利用し、各高分子溶液の pH を 7.4 に調整した。

0.3 mg の粉末 HVJ-E (GenomeONE CF-004, 石原産業株式会社) を 1 mL の PBS に溶解し、15000 rpm, 4 ºC の条件で 15 分間遠心分離し HVJ-E を洗浄した。上澄みを捨てたのち、沈降した HVJ-E を 500 µL の PBS に溶解した。次に、0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL に調整した GC, CH, PLL 溶液 500 µL に、前述した 500 µL の HVJ-E 溶液を加え、15 分間、4 ºC で高分子を吸着させた。その後、溶液を遠心分離 (15000 rpm, 4 ºC) し、上澄みを捨てたのち、更に 1 mL の PBS 溶液を加え、遠心分離 (同上) を行った。この洗浄/遠心分離の工程を 3 度繰り返し、カチオン性高分子をコーティングした HVJ-E を得た。500 µL のカチオン性高分子修飾 HVJ-E 溶液を 500 µL の HA 溶液に加え、15 分間、4 ºC で HA を吸着させた。吸着後、上記と同様の遠心分離/洗浄工程を繰り返し、HA 修飾 HVJ-E を得た。このカチオン性高分子と HA 修飾の高分子吸着を 6 回繰り返し、HA 修飾 HVJ-E を得た (Figure 2.4 e)。

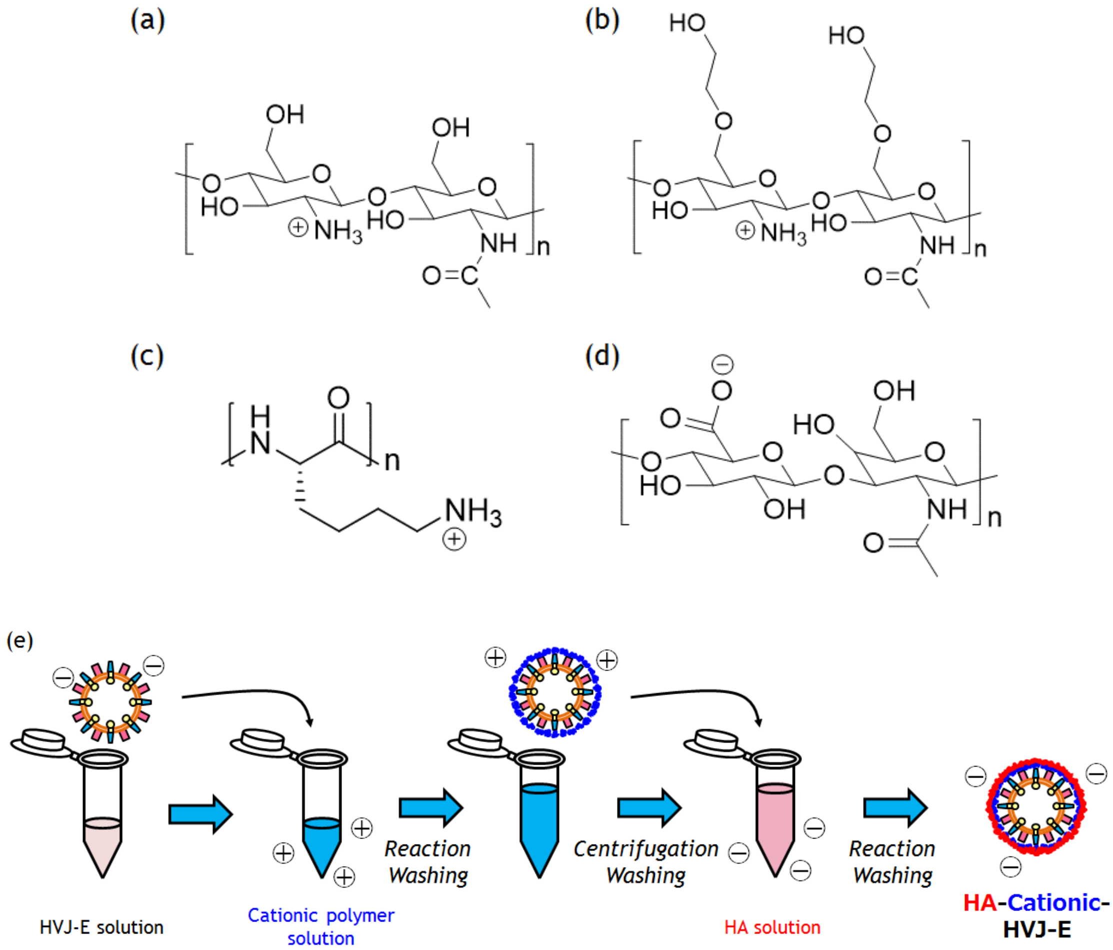

Figure 2.5. (a) CH, (b) GC, (c) PLL, (d) HA の高分子構造式と(e) HVJ-E 上への LbL 修飾方法 [34]

2.3.3. LbL 修飾 HVJ-E の評価

HVJ-E 上への高分子膜の集積は、動的光散乱法 (DLS: dynamic light scattering, DLS-8000) より評価した。75 mW のアルゴンレーザーのレーザー光を 90º の入射角で照射し、散乱光から HVJ-E の粒子径を算出した。HVJ-E の表面電位は光散乱電気泳動法 (ELS: electrophoretic light scattering, ELS-6000) により測定した。透過型電子顕微鏡 (TEM: Transmission Electron Microscope, JEM-1010) により、HVJ-E および LbL 修飾 HVJ-E の形状を評価した。サンプルは 2 wt % の 12 tungsten (VI) phosphoric acid *n*-hydrate 溶液により染色した。

2.3.4. QCM 法を用いた LbL 膜の評価

GC と HA の LbL 積層化を検討するために、水晶子マイクロバランス法 (QCM 法:Quartz crystal microbalance 法) を用いて評価した [35]。測定には 9MHz-QCM (QCA917, SEIKO EG&G) を用い、LbL 膜は 0.2 cm^2 の金基板上に作製し、水晶子の振動数変化を観察した。

2.3.5. LbL 膜のヒアルロン酸分解試験

ヒアルロン酸分解酵素を溶液に溶かし、1000 Unit / mL の hyaluronidase solution (pH 7.0, 20 mM sodium phosphate, 77 mM sodium chloride, 0.01 % bovine albumin) を調整した。250 µL の酵素溶液を 200 µL のリン酸緩衝液 (pH 5.35, 300 mM) と混合した。その溶液に 50 µL の PBS 溶液に溶解した、0.04 mg の HVJ-E, LbL 修飾 HVJ-E を加え、37 ºC で 24 時間インキュベートした。反応溶液を遠心分離 (15000 rpm, 4 ºC) し、上澄みの吸光度を測定し、酵素反応を定量した。

2.3.6. ヒアルロン酸修飾 HVJ-E の低 pH 溶液での安定性試験

HA を最外層とする LbL 修飾 HVJ-E (0.04 mg) を 1 mL の PBS に溶解した。溶液の pH を 0.1 M の HCl 水溶液を用いてそれぞれ 4.3, 6.0 に調整し、24 時間インキュベートした。作製した溶液中 HVJ-E の粒径を DLS により評価した。

2.3.7. LbL 修飾 HVJ-E の溶血活性試験

3 mL のニワトリ血液を 12 mL の PBS に溶解し、3 度遠心分離 (2500 rpm, 3min) した。沈降した赤血球を PBS に溶解し、2 % (v/v) に調整した。100 µL の赤血球溶液を 100 µL の HVJ-E, 1~6 層高分子を修飾した HVJ-E 溶液 (0.1 mg/mL) に加え、37 ºC で 2 時間インキュベートした。2 時間後、溶液を遠心分離 (2500 rpm, 3min) し、上澄みの吸光度 (541 nm) を測定した。

2.4. 結果と考察

2.4.1. HVJ-E の溶液中での物性評価

HVJ-E の表面修飾にあたり、HVJ-E の溶液中での性質を明らかとするため、各 pH 溶液中における表面電位（ζ-potentials）と粒子径をレーザーゼータ電位計 (ELS) と動的光散乱光法 (DLS) により評価した (Figure 2.6) 。

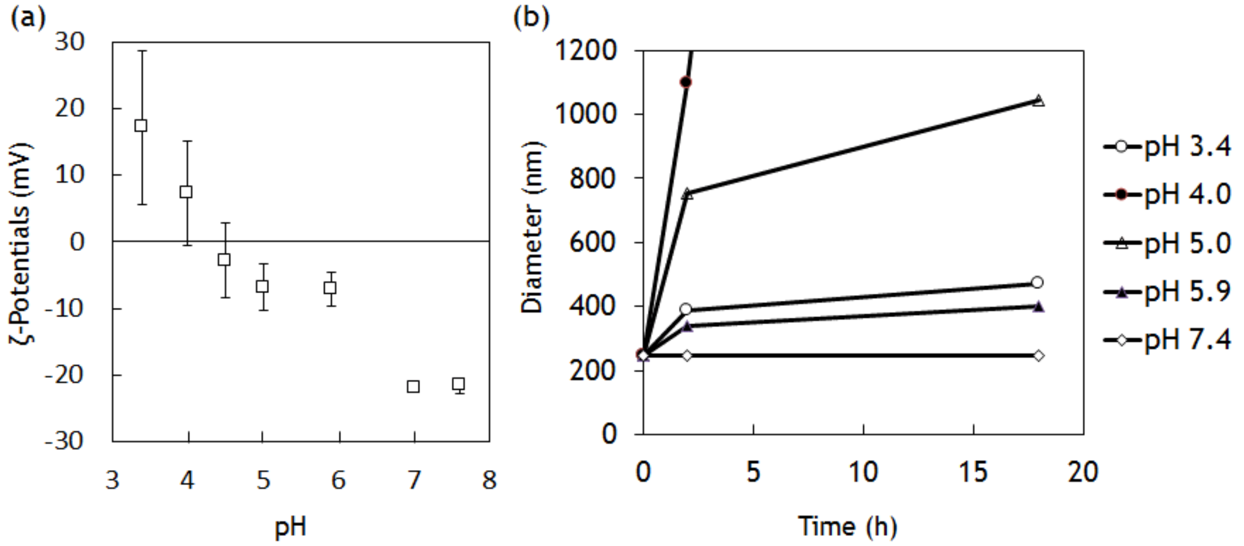

Figure 2.6. 溶液中の各 pH における (a) 表面電位の変化と (b) 時間変化に基づく粒径の変化 [34]

HVJ-E の表面電位は、生理条件下 (pH 7.4) において -20 mV 程度の負の値を示した。表面電位の値は溶液中の pH の低下と共に徐々に上昇し、pH 4.0 - 4.5 を境に正の値に転じる (Figure 2.6 a) 。この結果から、HVJ-E が pH 4.3 付近に等電点を有することが明らかとなった。一方、各溶液中における HVJ-E の粒子径の経時変化を DLS で観察すると、pH 7.4 を除くいずれの場合も粒径の上昇が観察された (Figure 2.6 b) 。特に pH 4.0 において、その凝集挙動は pH 3,4, 5.9 と比較し顕著であった。この原因として表面電位の影響が推察される。pH 3.4 と pH 5.9 は、いずれも表面電位が正、負に帯電しており、粒子間での静電的な反発を有する。一方、pH 4.0 においては等電点付近であることから、粒子間での静電的な反発が小さい。そのため、他の条件と比較し粒子の凝集が顕著であると考えられる。

これらの事実に加えて、凝集した HVJ-E を再度 pH 7.4 の溶液に浸漬させても凝集した粒子は再分散しない。そのため、HVJ-E の表面修飾工程においては、HVJ-E の粒子間凝集を最小限に抑えなければならない。本実験結果から、HVJ-E の表面修飾は生理条件下の pH で行い、且つ凝集を引き起こさない条件を探索する必要があることが示された。

2.4.2. HVJ-E 表面へのカチオン性高分子修飾

HVJ-E の LbL 修飾を困難にする要因として、①HVJ-E が非常に柔らかく、フレキシブルに動く脂質二分子膜を持つこと、②表面積が非常に小さいナノ粒子であることが挙げられる。加えて、弱電解質高分子であるヒアルロン酸の LbL 膜を生理条件下 (150 mM) の塩濃度条件で行った場合、静

電的な安定性を付加することが難しい。更に、③HVJ-E が等電点を持つこと、などが LbL の条件をさらに困難にさせる。そのため LbL 修飾 HVJ-E が LbL 修飾の工程で凝集を生じない条件の探索を行った。

HVJ-E は前述した通り、生理条件下である pH 7.4 においてアニオン電荷を有するため、ヒアルロン酸を HVJ-E 表面に直接修飾することはできない。そこで HVJ-E のヒアルロン酸修飾のための下地づくりとしてのカチオン性高分子の吸着条件を検討することとした。HVJ-E と PLL, CH, GC の 3 種類のカチオン性高分子を異なる高分子濃度で HVJ-E と反応させ、反応後の表面電位と粒子径を観察した (Figure 2.7) 。

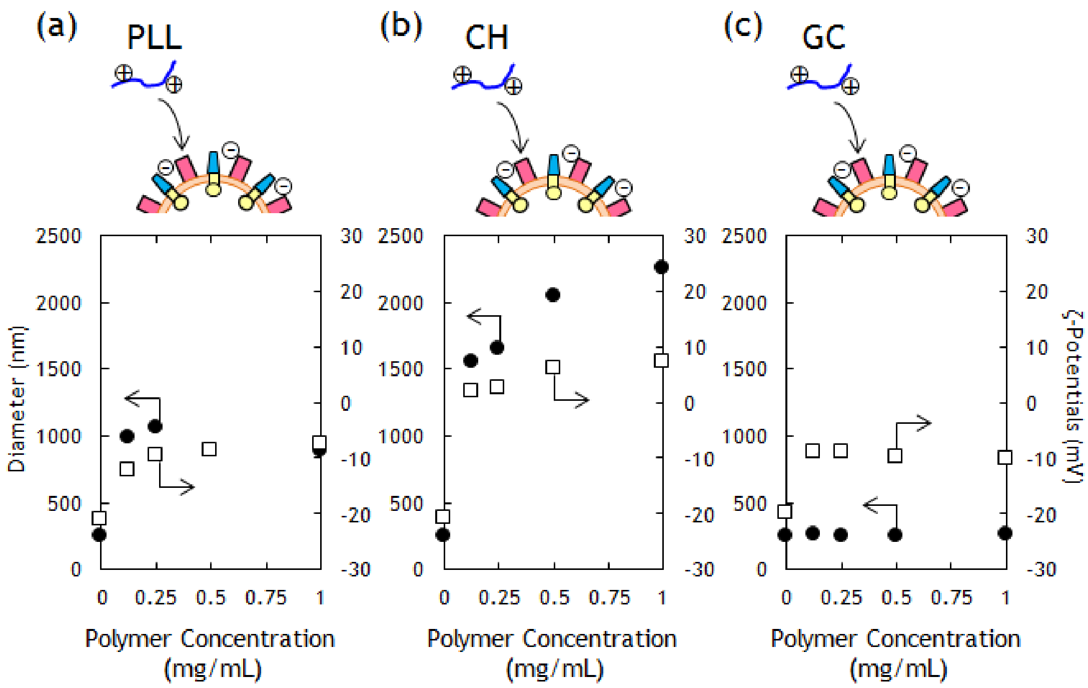

Figure 2.7. HVJ-E 表面へのカチオン性高分子 (a) PLL, (b) CH, (c) GC 吸着後の HVJ-E の粒径 (●) と表面電位 (□) [34]

HVJ-E の表面電位は pH 7.4, 150 mM の塩濃度の生理条件下では、- 20 mV 付近の負電荷に帯電していた。カチオン性高分子 3 種類との反応後、PLL では - 10 mV, CH では + 5 mV, GC では-10 mV であった (Figure 2.7 a, b, c) 。いずれのカチオン性高分子と反応後も、表面電位は正方向に上昇した。表面電位は、表面に存在するすべての電荷を考慮した値となる。高分子吸着後も HVJ-E が負電荷を維持している事実は、表面にカチオン性高分子は吸着しているが、HVJ-E の膜タンパク質や、カチオン性高分子に吸着した溶液中のリン酸イオンなどの総体的な表面電位は負に帯電していると考えられる。一方、DLS による粒径評価においては、約 250 nm の平均粒径を有する HVJ-E が、PLL と反応後には約 1000 nm、CH と反応後には約 2000 nm と、いずれも凝集体を形成していることが明らかとなった。PLL は pK_a を 9.0 付近にもつため、pH 7.4 の溶液では非常に強いカチオン電荷を有すると考えられる [36]。そのため溶液中では直鎖に近い構造を有していると考えられ、粒子間での架橋が容易である。加えて、柔らかくフレキシブルなエンベロープと強く作用し、遠心分離過程での膜の破壊なども同時に誘導すると考えられる。この予期しない凝集体の形成は CH と反応後にも観察された。CH は弱電解質であることに加え、反応条件である pH 7.4 という条件が、CH の pK_a (=6.5) を上回るため、正電荷が非常に弱い [37]。更に CH は溶解性が低く、粒子間での疎水性相

互作用による凝集体形成が誘起される。そのため約 2000 nm という大きな凝集体が形成されたと考えられる。

CH の溶解性向上のため、CH のヒドロキシル基にエチレングリコール基を導入した GC は遺伝子導入や Layer-by-Layer 法で利用されており [38,39]、本研究においても生分解性高分子の一種として利用できると考えられた。GC をカチオン性高分子として用いた場合には、0.125 mg/mL から 1.0 mg/mL いずれの GC と反応させた場合でも、表面電位は上昇し、約 250 nm の粒子径を維持していた。エチレングリコールをグラフトしたカチオン性高分子をナノ粒子上に被覆した場合や、ホスファチジルコリン基を導入した高分子の粒子上への修飾など、溶解度の高い高分子の修飾によって凝集を防げることはこれまでにも報告されている [40,41]。すなわち、これらの実験結果は、CH の溶解性の低さが HVJ-E の粒子間凝集を誘発したことを間接的に示唆している。

次に、カチオン性高分子を修飾した HVJ-E の TEM 観察を行った (Figure 2.8) 。HVJ-E の TEM 観察では、HVJ-E 粒子が単分散で、かつ球状の形態を有している (Figure 2.8 a)。一方、カチオン性高分子である PLL (Figure 2.8 b) および CH (Figure 2.8 c) と反応させた HVJ-E は、DLS での観察結果 (Figure 2.8 f, g) で示されたように、高分子が粒子間を架橋し凝集体を形成していることが TEM によっても観察された。一方、GC を修飾した HVJ-E においては、単分散を維持していた (Figure 2.8 d, h) 。DLS、表面電位、TEM の結果を併せて考慮すると、GC を用いた場合のみ、HVJ-E に粒子間凝集を引き起こすことなく、表面に GC を修飾することが出来たと考えられる。

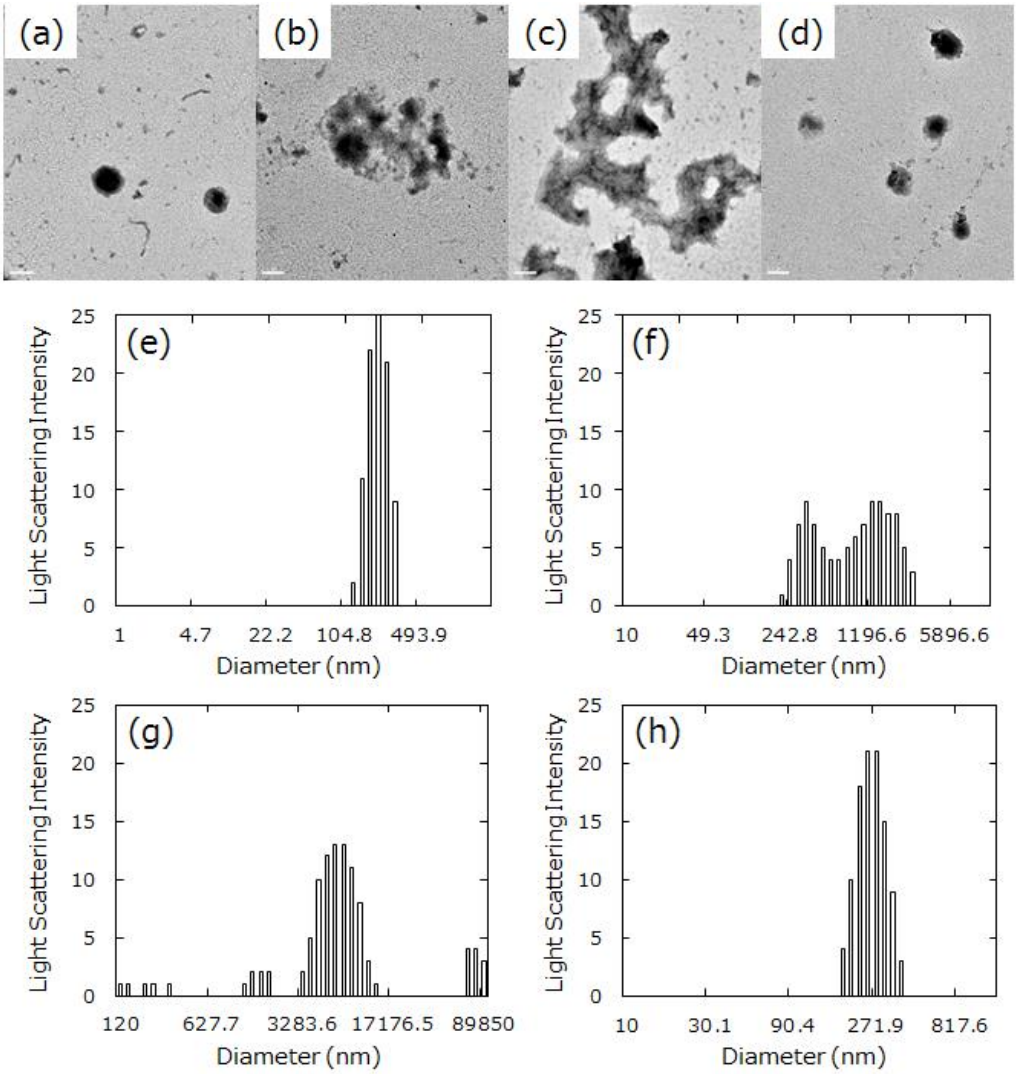

Figure 2.8. HVJ-E 上への高分子吸着前後での透過型電子顕微鏡図, (a) 未修飾 HVJ-E, (b) PLL, (c) CH, (d) GC 吸着後。および、(e-h) 各 HVJ-E の粒子数ヒストグラム [34]

2.4.3. GC-HVJ-E 表面へのヒアルロン酸 (HA) 修飾

次に、GC を吸着させた HVJ-E 表面に対し、HA の吸着を試みた。通常、粒子表面への HA の LbL 修飾においては、生理条件下での塩濃度 (150 mM) において、表面修飾後の粒子の分散性が非常に悪くなる。HA は溶液中で二重らせん構造をとるため、高分子量の HA であると、粒子間での凝集が起きやすい [42]。この事実が、ナノ粒子表面への HA の LbL 修飾を困難にする。一方、塩濃度を 1 mM まで下げて LbL 修飾を行うと、HVJ-E は凝集することなく容易に修飾される。しかしながら、低塩濃度環境で作製した弱電解質膜は、塩濃度が変化すると（例えば生体内に移植後）、すみやかに膜が崩壊してしまう [34,43]。そのため、HA の吸着においても pH 7.4, 150 mM の生理条件下において吸着させる必要がある。

HA 溶液を所定濃度に調整し、GC を修飾した HVJ-E に加え、GC と静電相互作用を生じさせ、反応を DLS と ELS により評価した (Figure 2.9) 。GC 修飾後の HVJ-E は、表面電位が –10 mV 程度、粒径が 250 nm 程度であった。HA 濃度を 0.125 mg/mL から 1.0 mg/mL に上昇させていくと、反応

後のゼータ電位の値が、徐々に減少していき、- 20 mV 程度にまで減少した。一方、HVJ-E の粒子径は反応前とほぼ変わらず、250 nm 程度のままを維持しており、凝集を生じたような大きな変化は見られなかった。ゼータ電位の値が負に減少していることから、HVJ-E の凝集を防ぎつつ、表面へ HA が修飾されたことが示された。

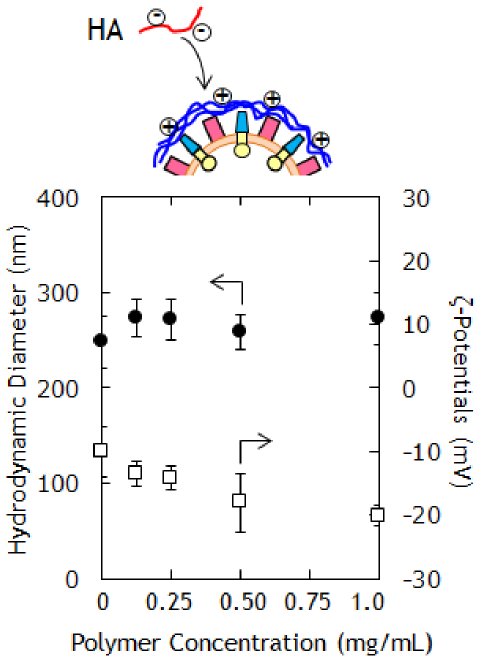

Figure 2.9. GC-HVJ-E 表面への HA 修飾における HA の溶液濃度が与える粒径 (●) と表面電位 (□) への影響[34]

2. 4. 4. Layer-by-Layer 法による高分子膜積層化

2.2 項で述べたように、本章での目的は、HVJ-E 表面に HA を被覆することで、HVJ-E に癌細胞への能動的標的能を付与すること、および赤血球凝集作用を低減させることである。LbL 法は高分子の積層回数をコントロールすることで、修飾した高分子の膜厚をコントロールできる。また、LbL 膜の膜厚のコントロールにより、将来的には LbL 膜間への薬物の担持や量のコントロール、更には磁性粒子や抗体の固定化など、より高度な機能をもつ HVJ-E を開発可能である。つまり、HVJ-E の表面上に高分子を多層積層させる技術の開発は HVJ-E の機能化において重要である。

前項にて、HVJ-E 表面への高分子修飾の条件を確立したため、HVJ-E 上への LbL 修飾を 6 層行った。表面修飾の工程は、DLS と ELS、TEM により評価した (Figure 2.10) 。HVJ-E の平均粒径は、高分子の積層回数の増加に伴い徐々に増加し、6 層被覆後には約 320 nm へと上昇した (Figure 2.10 a)。表面電位の変化も評価すると、カチオン性高分子の GC 被覆時には表面電位が上昇し、アニオン性高分子の HA 被覆時には減少することが確認された (Figure 2.10 b)。表面電位の増減は、高分子が静電相互作用を駆動力として表面に積層化していることを示唆している。これら 2 つの結果を併せて考慮すると、HVJ-E が凝集することなく、表面に高分子が積層化されていることが示された。

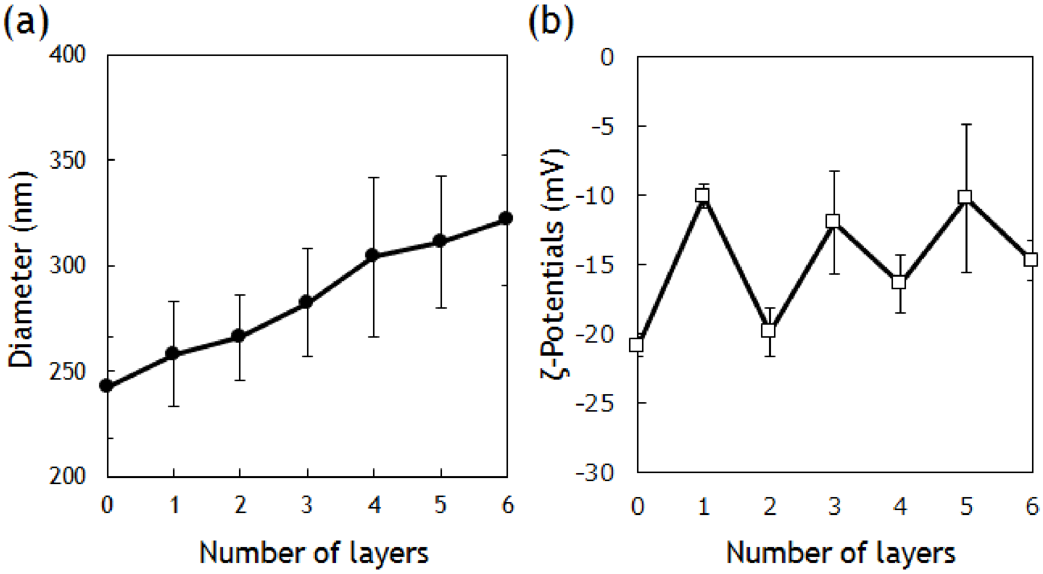

Figure 2.10. HVJ-E 上への GC と HA の Layer-by-Layer 修飾における (a) 粒径 と (b) 表面電位の変化 [34]

続いて、表面修飾をした HVJ-E を TEM により評価した (Figure 2.11)。TEM での観察においても、LbL 修飾に伴う HVJ-E の単分散性の維持が確認された。TEM 観察から HVJ-E の粒径を算出したところ、LbL 修飾を０、２、３、４、５、６回積層した各積層回数において、それぞれ 244±32 nm、266±19 nm、302±40 nm、306±36 nm、346±73 nm、355±45 nm であった。TEM での観察においても、HVJ-E の粒子径増加が確認された。DLS, ELS, TEM いずれの結果も、高分子の積層化を強く示す結果である。

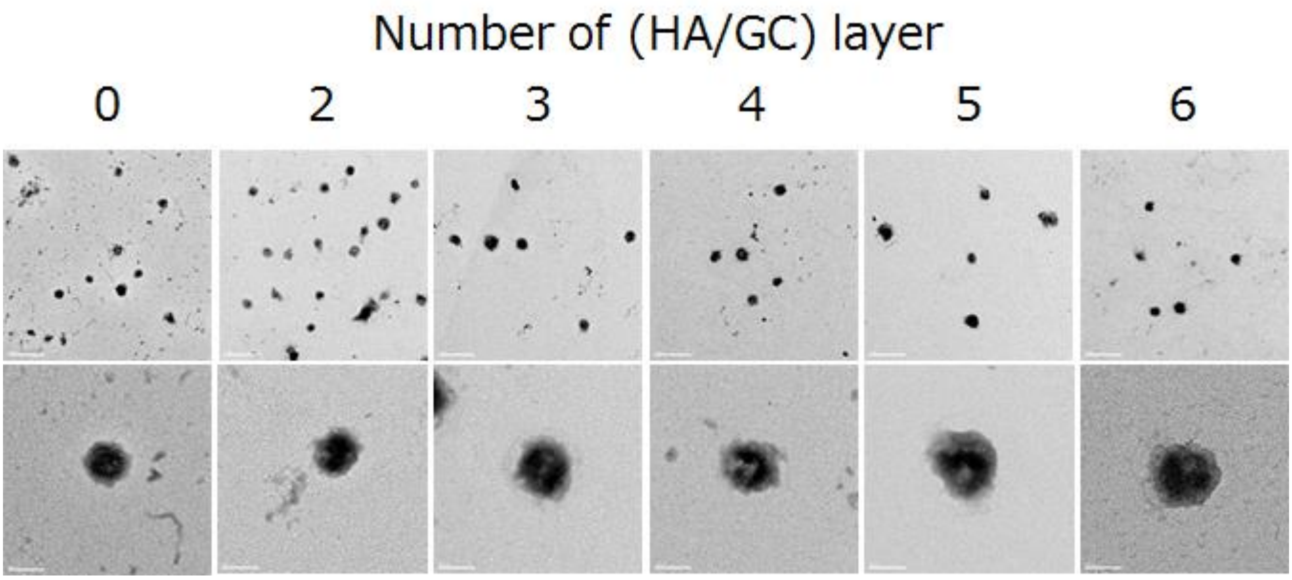

Figure 2.11. 未修飾と LbL 修飾 HVJ-E の TEM 観察 (上: scale bar = 1.0 µm. 下: scale bar = 200 nm)[34]

2.4.5 LbL 修飾 HVJ-E のヒアルロン酸分解試験

HA の分解は、細胞の増殖や分化、その他、多岐にわたる生理活性に関与していることが知られており、近年盛んに研究されている [44]。HA を分解する HA 分解酵素は生体内の多くの細胞外マトリックス、細胞質内部、血液中など広く存在することが知られている。また、癌細胞の周囲に HA 分解酵素が多く存在することも明らかとなっており、癌の浸潤とも密接な関わりがあることも示唆されている [45,46]。本研究において表面に修飾した HA が、癌細胞への標的能を発現し、癌細胞に吸着したのちに、HA 分解酵素により分解することが出来れば、癌細胞への能動的標的能を発現後、癌細胞に吸着した HVJ-E の抗腫瘍活性を意図的に発現させることができると期待した。そこで、高分子を積層した HVJ-E の HA 分解試験を行い、試験後の粒径とゼータ電位を評価することで、HVJ-E の LbL 膜分解性を検討した (Figure 2.12) 。

Figure 2.12 (a) に HA 分解後の粒径とゼータ電位の値を示した。酵素反応前に直線的な粒径増加を示していた HVJ-E の粒径 (Figure 2. 10a) は、酵素分解後には 0 – 2 層、3 – 4 層、また、5 - 6 層でほぼ同等の値を示した。つまり、HA 最外層の場合、粒子径が減少していた。一方、表面電位の値は高分子の積層回数に関わらず、-5 ~ -10 mV の値を示した。興味深いことに、コントロールサンプルである未被覆 HVJ-E のゼータ電位も増加していた。

HA 分解酵素は pI を 8~9 の間に持っており、pH 7.4 溶液ではカチオンに帯電している [47]。そのため、HVJ-E あるいは高分子積層 HVJ-E（カチオン性高分子最外層においてもゼータ電位はアニオンを有するため）の表面に吸着可能である。粒子径の計測と合わせて考慮すると、最外層の HA のみが分解され、反応後の HA 分解酵素は、HVJ-E 粒子上に吸着していると考えられる (Figure 2.12 b) 。

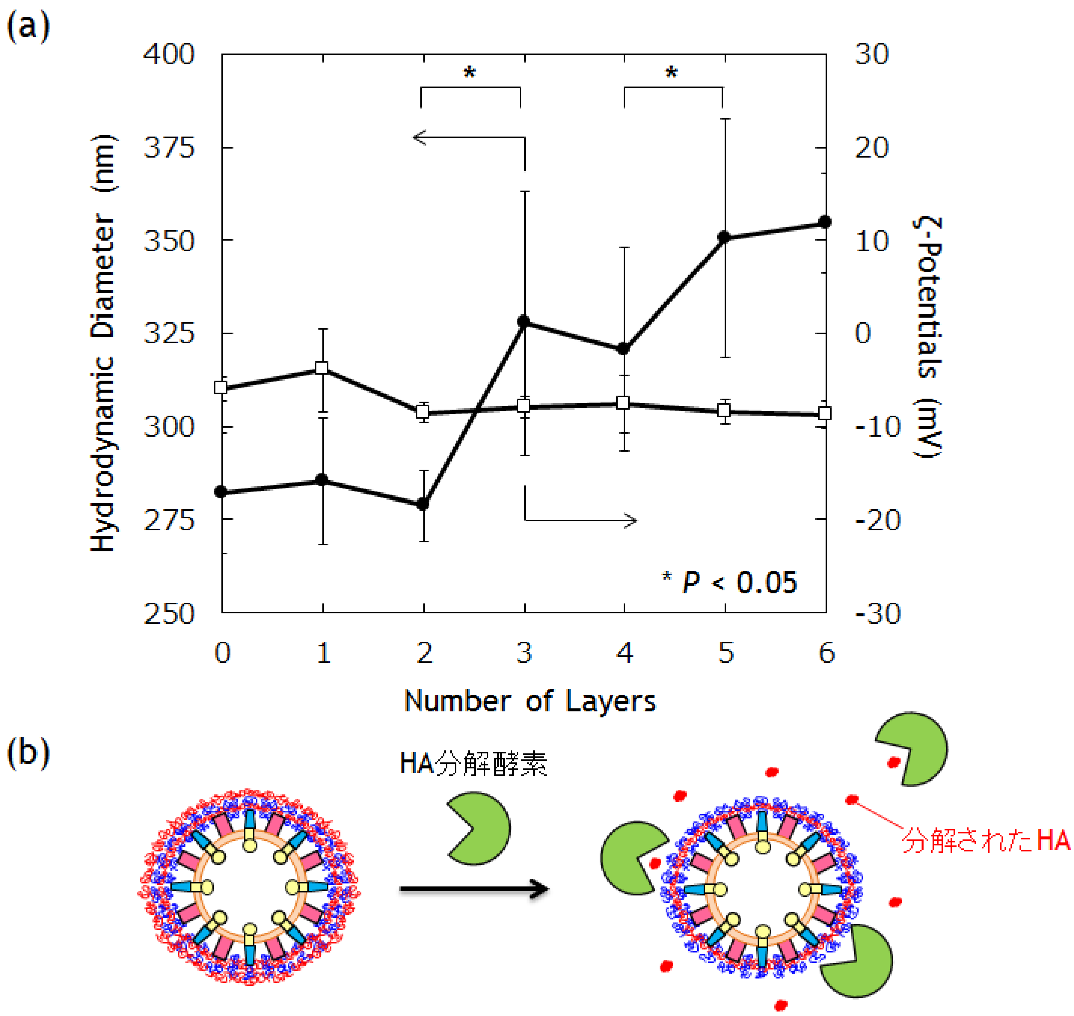

Figure 2.12. (a) HA 分解酵素と反応後の HVJ-E の粒径、および表面電位 (b) HA 分解の概念図 [34]

2. 4. 6.　LbL 修飾 HVJ-E の pH 耐性

HVJ-E 粒子表面に存在する高分子層が、目的細胞内において pH 依存的に崩壊することで、血中・細胞外においては HVJ-E の抗腫瘍活性が発現せず、目的細胞においてその効果が発現されるのではないかと期待した。そこで、HVJ-E 表面に被覆した高分子層が、pH 変化に応じて破壊されるかどうかを、異なる pH 溶液へ浸漬させることにより検討した。一般的に、生体内においては細胞外マトリックスにおける pH は約 6.0-7.4、細胞内では減少し 5.0-6.0 であることが知られている [48]。そこで高分子を 0、2、4、6 層被覆した HVJ-E を pH 7.4（生理条件）、6.0 (癌近傍 pH)、5.0 (エンドソームの pH)、4.3 (HVJ-E の等電点) の、それぞれの溶液に 24 時間浸漬させた。24 時間後、各溶液中の HVJ-E の粒径を DLS と TEM により評価した (Figure 2.13) 。

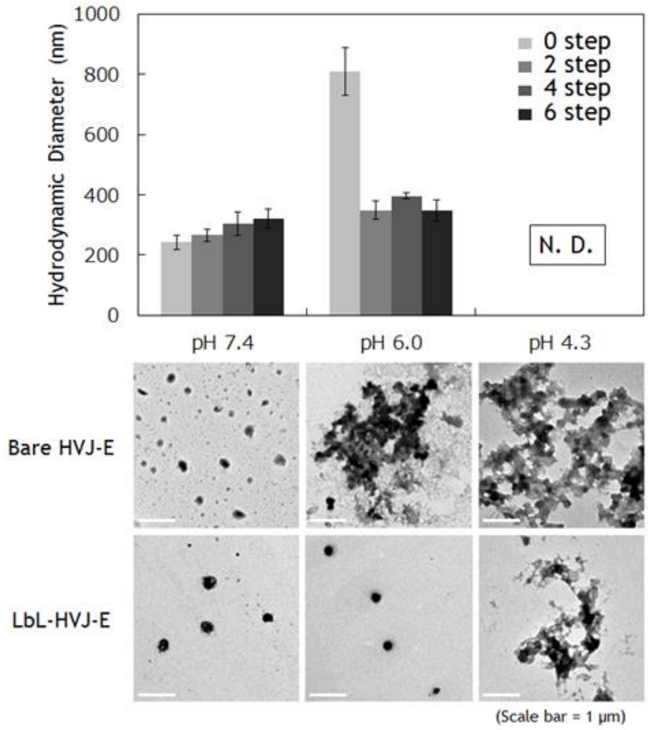

Figure 2.13. 未修飾 HVJ-E と LbL 修飾 HVJ-E の pH 7.4, 6.0, 4.3 における粒子径 (上) と TEM 像 (下)[34]

HVJ-E の粒径は、pH 7.4 溶液中では 24 時間後も単分散性を維持していた。一方、癌近傍と同等の pH 6.0 において、未被覆 HVJ-E は凝集したが (Figure 2.6) 、HA を最外層に有する HVJ-E は、pH 6.0 においても、その単分散性を維持していた。この結果は、HVJ-E 上への高分子修飾を強く示唆する結果である。一方、pH を HVJ-E の等電点である 4.3 まで減少させると、LbL 被覆・未被覆関わらず、HVJ-E は凝集した。等電点において HVJ-E の膜表面の電荷が著しく減少することで、HVJ-E 表面と LbL 膜間の静電的相互作用が消失し、LbL 膜が剥がれ、HVJ-E が凝集したと考えられる。pH 変化によって HVJ-E 表面が露出するという事実は、HVJ-E の抗腫瘍効果を癌近傍において発現させるために強く寄与すると考えられる。

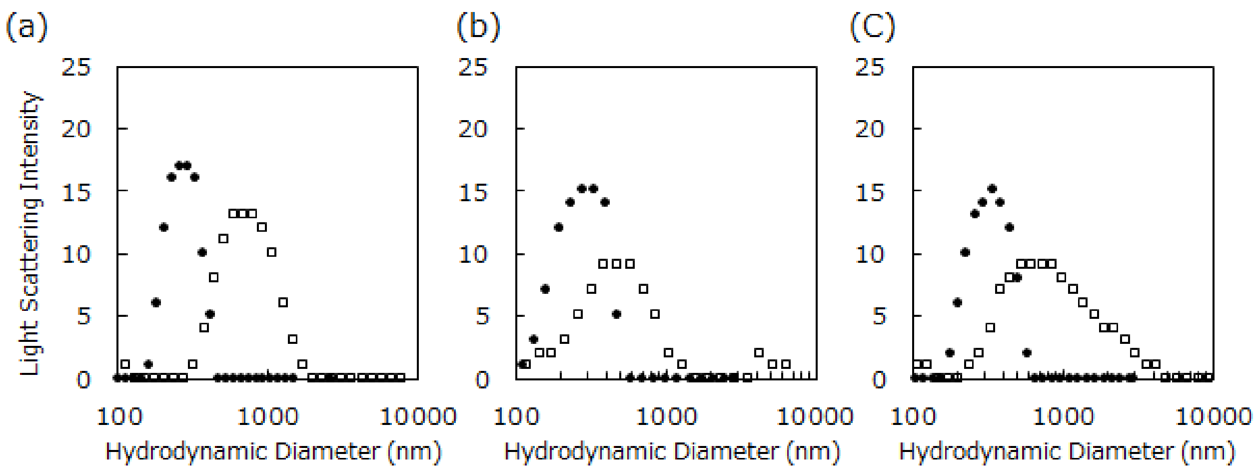

Figure 2.14. (a) 2, (b) 4, (c) 6 層 LbL 修飾 HVJ-E の pH 5.0 溶液への添加前 (●) と 添加後 (□)[34]

エンドソームの pH である pH 5.0 における HVJ-E の凝集を DLS により評価すると、単分散性を維持していた試験前と比較し、約 1 μm 程度の凝集体を生じることが示された (Figure 2.14) 。この結果も、本作製 HVJ-E が細胞外においては安定的に LbL 修飾されており、細胞内における pH 低下に伴う膜の崩壊により、より効率的に抗腫瘍効果を発現できる可能性を示している。

2.4.7. LbL 修飾 HVJ-E の溶血活性

ウイルスは一般的に、赤血球と反応することで赤血球溶血活性を示すことが知られている。ウイルスの膜タンパク質は、細胞の脂質二重膜を貫通し、ウイルスと細胞とを融合する [49]。この際、赤血球内部のヘモグロビンが溶出する。ヘモグロビン量を定量することで、ウイルスの膜タンパク質活性を評価することが可能である。そこで、作製した HVJ-E の膜タンパク質が LbL 修飾後も活性を維持しているかどうかを、赤血球の溶血試験により評価した (Figure 2.15) 。

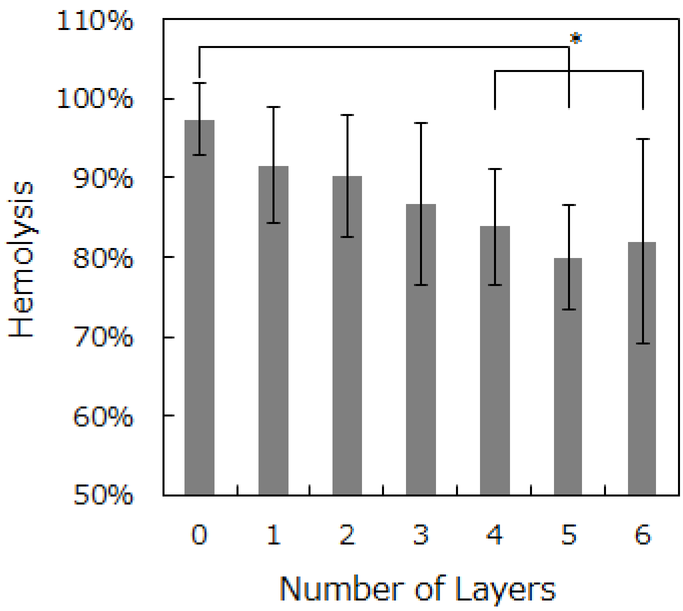

Figure 2.15. 溶血活性試験. LbL 層が多くなるにつれて HVJ-E の溶血活性は小さくなる [34].

LbL 修飾を 1-6 層被覆した HVJ-E と未被覆 HVJ-E を赤血球と反応させ、溶出したヘモグロビン量を定量すると、LbL の回数の増加に伴いヘモグロビンの溶出量が減少した。LbL 修飾に伴い、溶血活性を完全に抑えることはできなかったが、LbL の回数をより増やすことで HVJ-E の膜タンパク質の活性を完全に抑えることが出来るであろう。しかしながら、本技術開発により、血中における安定性を通常の HVJ-E と比較して、上昇させることに成功した。

2.5. 結言

本研究では、HVJ-E のような脂質二重膜を有するウイルスエンベロープ膜上に、LbL 修飾を初めて行った。HVJ-E 上への高分子修飾では、生体適合性高分子修飾に伴う HVJ-E 粒子の凝集が課題となった。様々な高分子を検討した中で、GC の利用によりエンベロープ膜上に HVJ-E の凝集を防ぎつつ HA を修飾することが可能であることを明らかとした。作製した LbL 膜はエンドソーム pH 低下に伴い崩壊し、内部 HVJ-E が露出する可能性が示唆された。更に LbL 修飾を施すことにより、赤血球の溶血作用が減少することも見出した。LbL 修飾技術を利用することで HVJ-E の抗腫瘍治療効果が、今後更に向上すると考えられる。

2.6. 参考文献

(1) Iwasaki, Y.; Ota, T. Efficient Biotinylation of Methacryloyl-Functionalized Nonadherent Cells for Formation of Cell Microarrays. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10329–10331.

(2) Lewis, J. D.; Destito, G.; Zijlstra, A.; Gonzalez, M. J.; P, J.; Biology, V.; Scripps, T.; Torrey, N.; Road, P.; Jolla, L.; et al. Viral Nanoparticles as Tools for Intravital Vascular Imaging. *Nat. Med.* **2008**, *12*, 354–360.

(3) Veerabadran, N. G.; Goli, P. L.; Stewart-Clark, S. S.; Lvov, Y. M.; Mills, D. K. Nanoencapsulation of Stem Cells within Polyelectrolyte Multilayer Shells. *Macromol Biosci* **2007**, *7*, 877–882.

(4) Prasuhn Jr, D. E.; Singh, P.; Strable, E.; Steven, B.; Manchester, M.; Finn, M. G. Plasma Clearance of Bacteriophage Qβ Particles as a Function of Surface Charge. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *18*, 1199–1216.

(5) Teramura, Y.; Iwata, H. Cell Surface Modification with Polymers for Biomedical Studies. *Soft Matter* **2010**, *6*, 1081–1091.

(6) Mansouri, S.; Merhi, Y.; Winnik, F. M.; Tabrizian, M. Investigation of Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolytes on Fully Functional Human Red Blood Cells in Suspension for Attenuated Immune Response. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 585–592.

(7) Anraku, Y.; Kishimura, A.; Kobayashi, A.; Oba, M.; Kataoka, K. Size-Controlled Long-Circulating PICsome as a Ruler to Measure Critical Cut-off Disposition Size into Normal and Tumor Tissues. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6054–6056.

(8) Campos, S. K.; Barry, M. a. Current Advances and Future Challenges in Adenoviral Vector Biology and Targeting. *Curr. Gene Ther.* **2008**, *7*, 189–204.

(9) Fisher, K. D.; Stallwood, Y.; Green, N. K.; Ulbrich, K.; Mautner, V.; Seymour, L. W. Polymer-Coated Adenovirus Permits Efficient Retargeting and Evades Neutralising Antibodies. *Gene Ther.* **2001**, *8*, 341–348.

(10) Lanciotti, J.; Song, A.; Doukas, J.; Sosnowski, B.; Pierce, G.; Gregory, R.; Wadsworth, S.; O'Riordan, C. Targeting Adenoviral Vectors Using Heterofunctional Polyethylene Glycol FGF2 Conjugates. *Mol. Ther.* **2003**, *8*, 99–107.

(11) Nakanishi, T.; Fukushima, S.; Okamoto, K.; Suzuki, M.; Matsumura, Y.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. Development of the Polymer Micelle Carrier System for Doxorubicin. *J. Control. Release* **2001**, *74*, 295–302.

(12) Sutton, T. C.; Scott, M. D. The Effect of Grafted Methoxypoly(ethylene Glycol) Chain Length on the Inhibition of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection and Proliferation. *Biomaterials* **2010**, *31*, 4223–4230.

(13) Nishiyama, N.; Kataoka, K. Preparation and Characterization of Size-Controlled Polymeric Micelle Containing Cis-dichlorodiammineplatinum(II) in the Core. *J. Control. Release* **2001**, *74*, 83–94.

(14) Jiang, X.; Zhang, G.; Narain, R.; Liu, S. Fabrication of Two Types of Shell-Cross-Linked Micelles with “Inverted” Structures in Aqueous Solution from Schizophrenic Water-Soluble ABC Triblock Copolymer via Click Chemistry. *Langmuir* **2009**, *25*, 2046–2054.

(15) Mitra, S.; Gaur, U.; Ghosh, P. C.; Maitra, a. N. Tumour Targeted Delivery of Encapsulated Dextran-Doxorubicin Conjugate Using Chitosan Nanoparticles as Aarrier. *J. Control. Release* **2001**, *74*, 317–323.

(16) Nochi, T.; Yuki, Y.; Takahashi, H.; Sawada, S.; Mejima, M.; Kohda, T.; Harada, N.; Kong, I. G.; Sato, A.; Kataoka, N.; et al. Nanogel Antigenic Protein-Delivery System for Adjuvant-Free Intranasal Vaccines. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 572–578.

(17) Maeda, H. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41*, 189–207.

(18) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760.

(19) Luo, Y.; Kirker, K. R.; Prestwich, G. D. Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogel Films: New Biomaterials for Drug Delivery. *J. Control. Release* **2000**, *69*, 169–184.

(20) Park, S. N.; Park, J. C.; Kim, H. O.; Song, M. J.; Suh, H. Characterization of Porous Collagen/hyaluronic Acid Scaffold Modified by 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Cross-Linking. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1205–1212.

(21) Yamane, S.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Funakoshi, T.; Masuko, T.; Harada, K.; Minami, A.; Monde, K.; Nishimura, S. I. Feasibility of Chitosan-Based Hyaluronic Acid Hybrid Biomaterial for a Novel Scaffold in Cartilage Tissue Engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 611–619.

(22) Aigner, J.; Tegeler, J.; Hutzler, P.; Campoccia, D.; Pavesio, a; Hammer, C.; Kastenbauer, E.; Naumann, a. Cartilage Tissue Engineering with Novel Nonwoven Structured Biomaterial Based on Hyaluronic Acid Benzyl Ester. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42*, 172–181.

(23) Lokeshwar, V. B.; Obek, C.; Soloway, M. S.; Block, N. L. Tumor-Associated Hyaluronic Acid: A New Sensitive and Specific Urine Marker for Bladder Cancer. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 773–777.

(24) Lokeshwar, V.; Rubinowicz, D. Hyaluronic Acid and Hyaluronidase: Molecular Markers Associated with Prostate Cancer Biology and Detection. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **1999**, *2*, S21.

(25) Thomas, L.; Etoh, T.; Stamenkovic, I.; Mihm Jr., M. C.; Byers, H. R. Migration of Human Melanoma Cells on Hyaluronate Is Related to CD44 Expression. *Journal of Investigative Dermatology*, **1993**, *100*, 115–120.

(26) Louderbough, J. M. V; Schroeder, J. A. Understanding the Dual Nature of CD44 in Breast Cancer Progression. *Mol. Cancer Res.* **2011**, *9*, 1573–1586.

(27) Lopez, J. I.; Camenisch, T. D.; Stevens, M. V.; Sands, B. J.; McDonald, J.; Schroeder, J. a. CD44 Attenuates Metastatic Invasion during Breast Cancer Progression. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6755–6763.

(28) Surace, C.; Arpicco, S.; Dufaÿ-Wojcicki, A.; Marsaud, V.; Bouclier, C.; Clay, D.; Cattel, L.; Renoir, J. M.; Fattal, E. Lipoplexes Targeting the CD44 Hyaluronic Acid Receptor for Efficient Transfection of Breast Cancer Cells. *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 1062–1073.

(29) Ossipov, D. a. Nanostructured Hyaluronic Acid-Based Materials for Active Delivery to Cancer. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 681–703.

(30) Yang, X. Y.; Li, Y. X.; Li, M.; Zhang, L.; Feng, L. X.; Zhang, N. Hyaluronic Acid-Coated Nanostructured Lipid Carriers for Targeting Paclitaxel to Cancer. *Cancer Lett.* **2013**, *334*, 338–345.

(31) Eliaz, R. E.; Szoka, J. Liposome-Encapsulated Doxorubicin Targeted to CD44: A Strategy to Kill CD44-Overexpressing Tumor Cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 2592–2601.

(32) Kurooka, M.; Kaneda, Y. Inactivated Sendai Virus Particles Eradicate Tumors by Inducing Immune Responses through Blocking Regulatory T Cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 227–236.

(33) Kawaguchi, Y.; Miyamoto, Y.; Inoue, T.; Kaneda, Y. Efficient Eradication of Hormone-Resistant Human Prostate Cancers by Inactivated Sendai Virus Particle. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2478–2487.

(34) Okada, T.; Uto, K.; Sasai, M.; Lee, C. M.; Ebara, M.; Aoyagi, T. Nano-Decoration of the Hemagglutinating Virus of Japan Envelope (HVJ-E) Using a Layer-by-Layer Assembly Technique. *Langmuir* **2013**, 7384–7392.

(35) Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen Zur Wagungdiinner Schichten Und Zur Mikrowagung. *Zeitschrift fur Phys.* **1959**, *155*, 206–222.

(36) Girod, S.; Boissière, M.; Longchambon, K.; Begu, S.; Tourne-Pétheil, C.; Devoisselle, J. M. Polyelectrolyte Complex Formation between Iota-Carrageenan and poly(L-Lysine) in Dilute Aqueous Solutions: A Spectroscopic and Conformational Study. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *55*, 37–45.

(37) Strand, S. P.; Tømmeraas, T.; Vårum, K. M.; Østgaard, K. Electrophoretic Light Scattering Studies of Chitosans with Different Degrees of N-Acetylation. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1310–1314.

(38) Yoo, H. S.; Lee, J. E.; Chung, H.; Kwon, I. C.; Jeong, S. Y. Self-Assembled Nanoparticles Containing Hydrophobically Modified Glycol Chitosan for Gene Delivery. *J. Control. Release* **2005**, *103*, 235–243.

(39) Holmes, C. a; Tabrizian, M. Substrate-Mediated Gene Delivery from Glycol-Chitosan/hyaluronic Acid Polyelectrolyte Multilayer Films. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 524–531.

(40) Shutava, T. G.; Pattekari, P. P.; Arapov, K. A.; Torchilin, V. P.; Lvov, Y. M. Architectural Layer-by-Layer Assembly of Drug Nanocapsules with PEGylated Polyelectrolytes. *Soft Matter* **2012**, *8*, 9418–9427.

(41) Tiera, M. J.; Qiu, X.-P.; Bechaouch, S.; Shi, Q.; Fernandes, J. C.; Winnik, F. M. Synthesis and Characterization of Phosphorylcholine-Substituted Chitosans Soluble in Physiological pH Conditions. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3151–3156.

(42) Scott, J. E. Supramolecular Organization of Extracellular-Matrix Glycosaminoglycans, Invitro and in

the Tissues. *Faseb J.* **1992**, *6*, 2639–2645.

(43) Gittins, D. I.; Caruso, F. Tailoring the Polyelectrolyte Coating of Metal Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6846–6852.

(44) Lin, G.; Stern, R. Plasma Hyaluronidase (Hyal-1) Promotes Tumor Cell Cycling. *Cancer Lett.* **2001**, *163*, 95–101.

(45) Lokeshwar, V. B.; Lokeshwar, B. L.; Pham, H. T.; Block, N. L. Association of Elevated Levels of Hyaluronidase, a Matrix-Degrading Enzyme, with Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 651–657.

(46) Ekici, S.; Cerwinka, W. H.; Duncan, R.; Gomez, P.; Civantos, F.; Soloway, M. S.; Lokeshwar, V. B. Comparison of the Prognostic Potential of Hyaluronic Acid, Hyaluronidase (HYAL-1), CD44v6 and Microvessel Density for Prostate Cancer. *Int. J. Cancer* **2004**, *112*, 121–129.

(47) Reitinger, S.; Müllegger, J.; Greiderer, B.; Nielsen, J. E.; Lepperdinger, G. Designed Human Serum Hyaluronidase 1 Variant, HYAL1DeltaL, Exhibits Activity up to pH 5.9. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 19173–19177.

(48) Lee, R. J.; Wang, S.; Turk, M. J.; Low, P. S. The Effects of pH and Intraliposomal Buffer Strength on the Rate of Liposome Content Release and Intracellular Drug Delivery. **1998**, *18*, 69–78.

(49) Kaneda, Y.; Nakajima, T.; Nishikawa, T.; Yamamoto, S.; Ikegami, H.; Suzuki, N.; Nakamura, H.; Morishita, R.; Kotani, H. Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) Envelope Vector as a Versatile Gene Delivery System. *Mol. Ther.* **2002**, *6*, 219–226.

第 3 章

抗腫瘍効果を誘導可能な HVJ-E 徐放ナノファイバーの開発

3. 1. 緒言

3. 1. 1. 日本における癌の現状

日本において、悪性新生物、いわゆる”癌”は脳卒中・心疾患とともに三大疾病として広く知られている。癌による死亡者は年々増加しており、2014 年では全部位における死亡者は約 36 万人であった (Figure 3.1 a) 。これは日本人の死因第一位を占める [1]。部位別に見てみると、C型肝炎の感染数の減少によって肝臓癌の死亡数は減少傾向にある (Figure 3.1 b) 。一方、肝臓癌以外の部位ではおおむね増加傾向にあり、肺癌の死亡数増加は顕著である。癌の罹患者数も同様に増加傾向であり、国立がん研究センターの予測では、2015 年の癌罹患者数は約 98 万例と予測されている（うち死亡数 37 万人）[2]。すなわち、癌に対する予防・治療法開発は日本において喫緊の課題である。

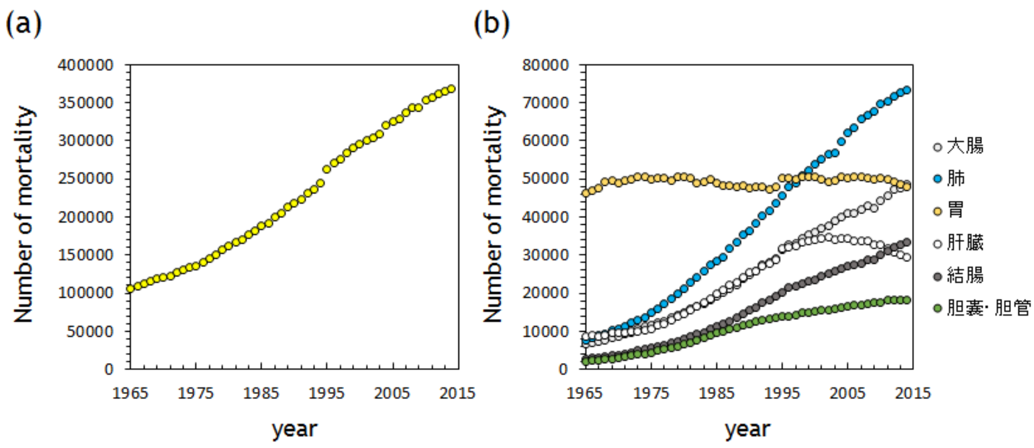

Figure 3.1. 日本における (a) 全癌患者死亡数推移と (b) 部位別死亡数推移 [1]

3. 1. 2. 癌治療方法

癌治療の手法は、外科療法、化学療法、放射線療法が主に用いられている。

外科療法とは、癌組織を外科手術により切除する手法である。転移癌でない限り、再発を予防可能である。近年では技術の進歩により、内視鏡による手術等、患者の負担の少ない治療法も開発されている [3]。

化学療法は、抗癌剤を利用し、癌細胞の増殖を抑制、あるいは死滅させる手法である。抗癌剤としては、菌類や植物から抽出・同定された薬物が主に利用されている。例えば、抗癌剤の一種として有名なパクリタキセル (PTX) は北アメリカ西部に生息するイチイ科の針葉樹のキャラボクから抽出された薬物である [4]。PTX は作用機序として、微小管の阻害が挙げられる [5]。細胞分裂の過程において、細胞内の染色体は二組に分裂し、それぞれ異なる細胞に分配される。PTX は微小管から延びる紡錘糸の働きを阻害することで細胞分裂を抑制する。癌細胞は正常細胞と比較し、細胞分裂の速度が速いため、化学療法で PTX を全身投与した場合、癌細胞のような分裂速度の速い細胞選択的に細胞死を誘導することが可能となる。このメカニズムにより、白血球や毛髪細胞など増殖の速い細胞の細胞死をも誘導するため、白血球減少や末しょう神経障害、脱毛などの副作用を誘起する。しかしながら、化学療法は一般的な治療法として広く利用されている。

放射線療法は、癌部位に直接中性子をあてることにより、癌細胞の遺伝子を破壊し、癌細胞に細

胞死（アポトーシス）を誘導し、死滅させる手法である [6–8]。また、放射線療法と化学療法を組み合わせることにより、効率的に癌が治療されるようになってきた。更に近年では、従来の放射線療法に加え､ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT; Boron neutron capture therapy) などが注目されている (Figure 3.2) [9]。BNCT はホウ素を利用した癌治療方法である。ホウ素は中性子を当てることで lithium と alpha particle (LET) に分裂する。これらは中性子を当てたホウ素から約 10 µm の範囲の細胞を破壊することが可能である。ホウ素特異的に細胞死を誘導するため、癌細胞にホウ素を蓄積させる技術が必要である。ホウ素の癌部位集積のための技術開発、例えばホウ素内包高分子ミセルやリポソームの開発などの基礎技術開発がすすめられている [10–13]。

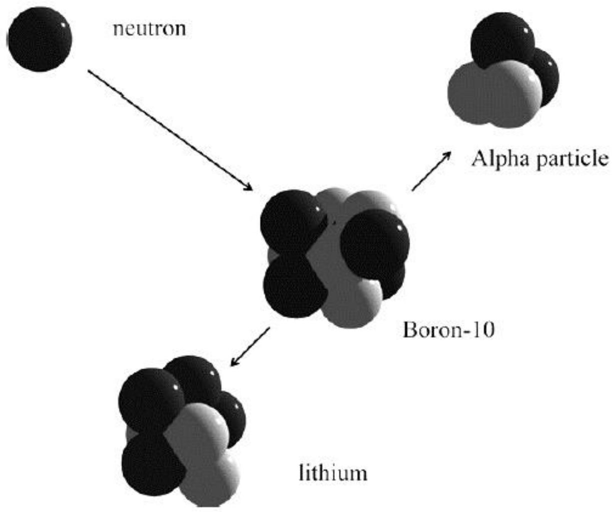

Figure 3.2. ホウ素中性子捕捉療法の概念図 [9]。中性子を Boron-10 に当てることで Lithium-7 と Alpha particle (LET; Linear energy transfer) が生じる

3.1.3. 温熱療法

近年、癌治療の新たな選択肢として、温熱療法や免疫療法が提案されている [14–16]。

温熱療法は、腫瘍細胞が腫瘍以外の細胞よりも熱に対して弱い特性を利用し、磁性粒子等を癌近傍に注入し、交流磁場をかけることで、癌近傍の発熱を誘導し、温度を上昇させることで癌を死滅させる方法である。一般的に細胞は、温度が 50 ºC を超えると、細胞膜が物理的に破壊され、細胞が死亡する（ネクローシス）[17]。一方、温熱療法では、細胞の温度を約 42-45 ºC に所定時間保つことで癌細胞に特異的に細胞死を誘導する。

細胞の温度が上昇すると、細胞の代謝が促進され、代謝の促進は細胞にとって有害な活性酸素 (ROS) の産生を誘起し、細胞に対し酸化ストレスを与える [14]。癌細胞は通常細胞と比較し、より代謝が活性化された細胞であるため、温度上昇に伴う ROS の産生は通常細胞と比較しても多く、より強い毒性を示す。過剰に産生された ROS は細胞の DNA に損傷を与えるため、細胞に対し細胞死（アポトーシス）を誘導する。近年、この温熱療法は磁性粒子を癌部位に投与し、外部から交流磁場をかけ、癌部位を直接温める方法が検討されてきた。

3.1.4. 温熱療法と各種治療法の併用

一方、温熱療法は放射線療法や化学療法などと併用されると、その抗癌活性が増大されることが知られている。温熱療法と放射線療法の併用は、既に臨床研究が実施されており、Hurwitz らの報告では、前立腺癌患者に対しこの治療法を行った場合、生存率の向上に寄与した[16]。Hu らは、Fe_3O_4 からなる磁性粒子表面に poly vinyl alcohol を修飾し抗癌剤を担持させた粒子を作製した[18]。その粒子をラットの癌部位に投与し、癌部位に交流磁場をあてることで、癌部位の温度を上昇させ、化学療法と温熱療法を同時に付与することに成功した。この方法では、温熱療法あるいは化学療法を、それぞれ個別に行った場合と比較し、同時に行うことで癌の治療効果が劇的に増大した。

Kim らは、温度応答性高分子 poly (*N*-isopropyl acrylamide) (PNIPAAm) 溶液に磁性ナノ粒子と抗癌剤を混合し、電界紡糸法を用いてナノファイバーメッシュを作製した[19] (Figure 3.3)。このナノファイバーは交流磁場を与えることでナノファイバー内部の磁性粒子が発熱し、ファイバーの構成成分である PNIPAAm が下限臨界溶液温度 (LCST) を超えることで疎水化し､ファイバーが収縮する。その際に、ナノファイバー内部から抗癌剤が放出される。この手法においても、温熱療法と化学療法をそれぞれ個別に行った場合と比較し、両方の治療を同時に行った場合、治療効果が劇的に増大した。更に本手法では、任意のタイミングに温熱療法と化学療法を与えることが出来るため、癌細胞の分裂時間を考慮し薬物を徐放させるなど、新たな治療法への展開が可能となる。このように近年、温熱療法と放射線療法・化学療法を併用する研究が行われている。

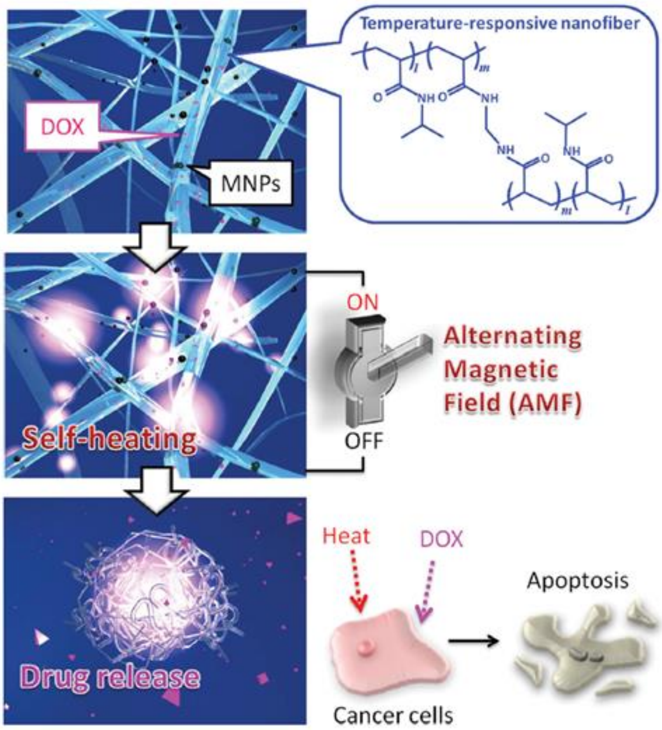

Figure 3.3. 温度応答性高分子 PNIPAAm から成る高分子ナノファイバーと磁性粒子・抗癌剤を組み合わせた新規治療法[19]

3.1.5. HVJ-E と化学療法の併用

HVJ-E には免疫系を活性化させ、IL-6 の分泌や癌に対する制御性 T 細胞の抑制、および Natural Killer 細胞の活性化により癌を死滅させる能力があることを第一章で述べた [20,21]。この HVJ-E と抗癌剤を併用することで、化学療法と免疫療法の相乗効果によって、抗腫瘍作用を高めることが Kawano らによって報告されている (Figure 3.4) [22]。加えて HVJ-E は放射線療法の併用も近年行われており、HVJ-E と各種の癌治療法を併用した治療法の開発が期待される [23]。

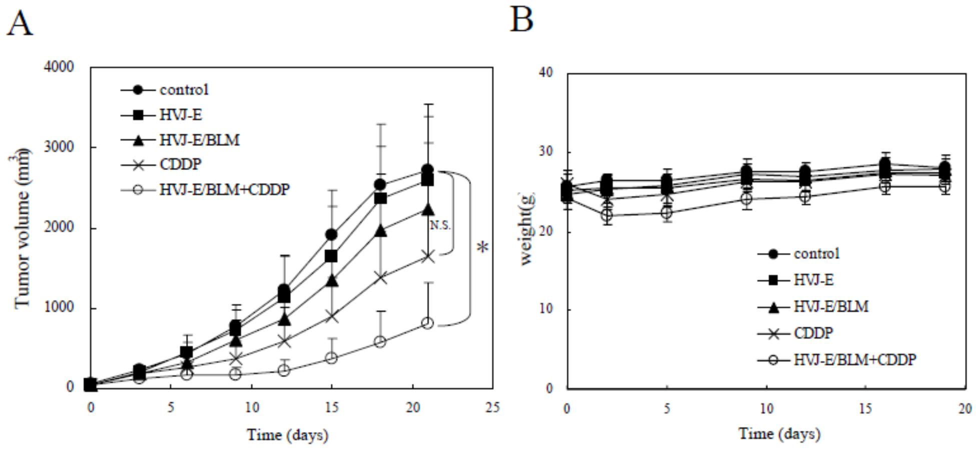

Figure 3.4. (a) HVJ-E と化学療法の併用による癌細胞重量の変化と(b) 体重変化 [22] (ブレオマイシン; BLM, 抗癌剤シスプラチン; CDDP)

3.2. ナノファイバー上への HVJ-E 固定化技術の開発

前述した通り、HVJ-E は化学療法や放射線療法など他種治療法と組み合わせることにより、その抗腫瘍効果を劇的に増大させることが、これまでの知見から明らかとなっている。しかし HVJ-E は生体内に注入後即座に拡散し、あるいは赤血球や細胞と吸着するため、所定時間癌部位に留まることはない。温熱療法や化学療法などと HVJ-E を組み合わせて長期間、癌治療の相乗効果を発現させるためには、HVJ-E を所定時間、徐放・滞留させる技術の開発が不可欠である。

そこで本章では、HVJ-E を比表面積が大きく、機械的特性に優れ、更にそのハンドリングの容易さから、様々な医療応用への展開が期待されているナノファイバー上への固定化を検討した。これまでの研究から、ナノファイバーの内部には抗癌剤や磁性粒子が封入可能であり、所定期間、ナノファイバー内部からの薬物徐放や磁性粒子の発熱反応を利用した温熱療法が実現可能である [19,24]。このナノファイバー上に HVJ-E を LbL 法により固定化し、所定期間徐放させることで、化学療法、温熱療法、更には免疫療法を同時に実現可能な新規癌治療法開発が実現できることを期待した (Figure 3.5) [25,26]。

しかし、HVJ-E のナノファイバー上への固定化技術、および固定化基板から徐放された HVJ-E が抗腫瘍効果を発現できるかどうかを示した知見はこれまでに得られていない。そこで本章では、ナノファイバー上への LbL 法 [27,28] を利用した HVJ-E の固定化と、LbL 膜から徐放された HVJ-E の抗腫瘍効果について検討した。

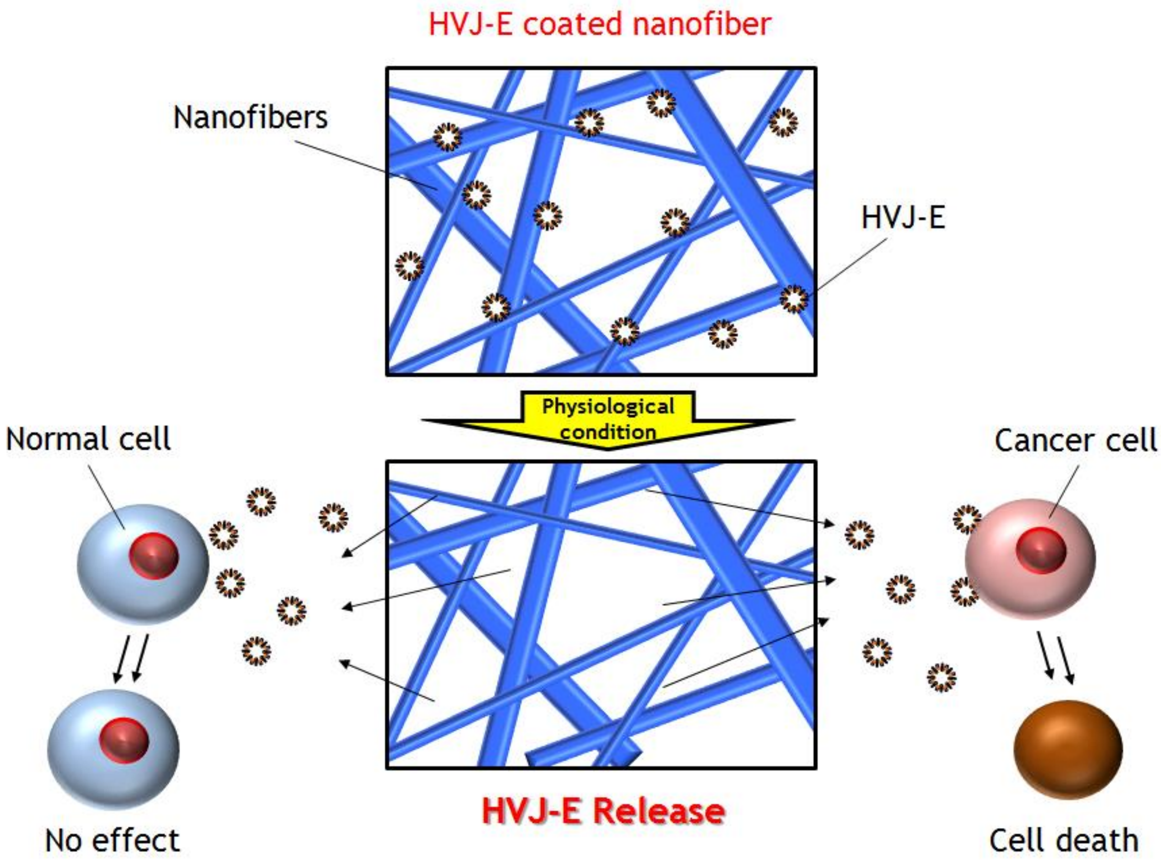

Figure 3.5. HVJ-E を修飾したナノファイバーとその徐放がもたらす癌細胞選択的な細胞死

3.3. 実験

3.3.1. 本実験の概要

ポリカプロラクトンのナノファイバーメッシュを電界紡糸法により作製した。作製したナノファイバー上に PLL とアルギン酸を用いて LbL 膜を作製した。最外層がカチオンである LbL 膜上に、アニオン電荷を有する HVJ-E を吸着させた。HVJ-E を固定化したナノファイバーを走査型電子顕微鏡、共焦点顕微鏡により観察した。HVJ-E のナノファイバーからの徐放を紫外分光光度計により評価した。最後に、徐放された HVJ-E の抗腫瘍効果を、前立腺癌細胞 PC-3 を用いて検討した。

3.3.2. ポリカプロラクトンナノファイバーの作製

poly caprolactone (PCL) は Ebara らの合成法に則り、ε-caprolactone モノマーを tin octanoate を用いて開環重合し、合成した [29]。作製した PCL を 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) に 20 wt/v% の濃度で溶解した。

ナノファイバーへの加工は高分子電解質溶液に高電圧を与え、糸状加工する技術である電界紡糸法を用いて行った。PCL 溶液を、23G のシリンジ注射針より 1.0 mL/h の溶出速度にて 20 kV の電圧をかけ、アルミニウム基板上に噴霧し、ナノファイバー状に加工した [24]。その後ナノファイバー

を真空乾燥し、HFIP を除去したのち、アルミニウムから剥離することで PCL ナノファイバーメッシュを得た。

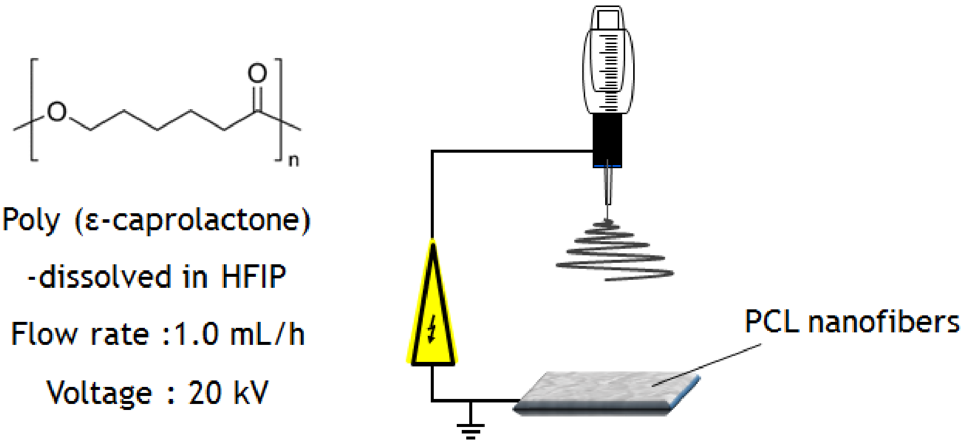

Figure 3.6. 電界紡糸法による PCL ナノファイバーの作製概念図

3.3.3. PCL ナノファイバー上への Layer-by-Layer 修飾

PLL と ALG、poly-ethylene imine (PEI) をそれぞれ pH 7.4 の HEPES / NaCl 緩衝液 (10 mM HEPES / 150 mM NaCl) に溶解した。それぞれの溶液の高分子濃度を 1.0 mg/mL, 5.0 mg/mL, 0.1 mg/mL に調整した。はじめに、PCL ナノファイバーを PEI 溶液に浸漬し、10 分間 PEI を吸着させた。その後、ナノファイバーを HEPES/NaCl 溶液に 2 分間浸漬し、余剰高分子を洗浄した。次に、PEI を修飾したナノファイバーを ALG 溶液に浸漬し、10 分間静置後、HEPES/NaCl 溶液で洗浄した。得られた ALG-PEI 修飾ナノファイバーを PLL 溶液に浸漬し、10 分間吸着後、HEPES/NaCl 溶液で洗浄した。こののち、PLL 溶液と ALG 溶液への浸漬、および HEPES/NaCl による洗浄を 13 回繰り返し、LbL 修飾を施したナノファイバーを得た (Figure 3.7)。

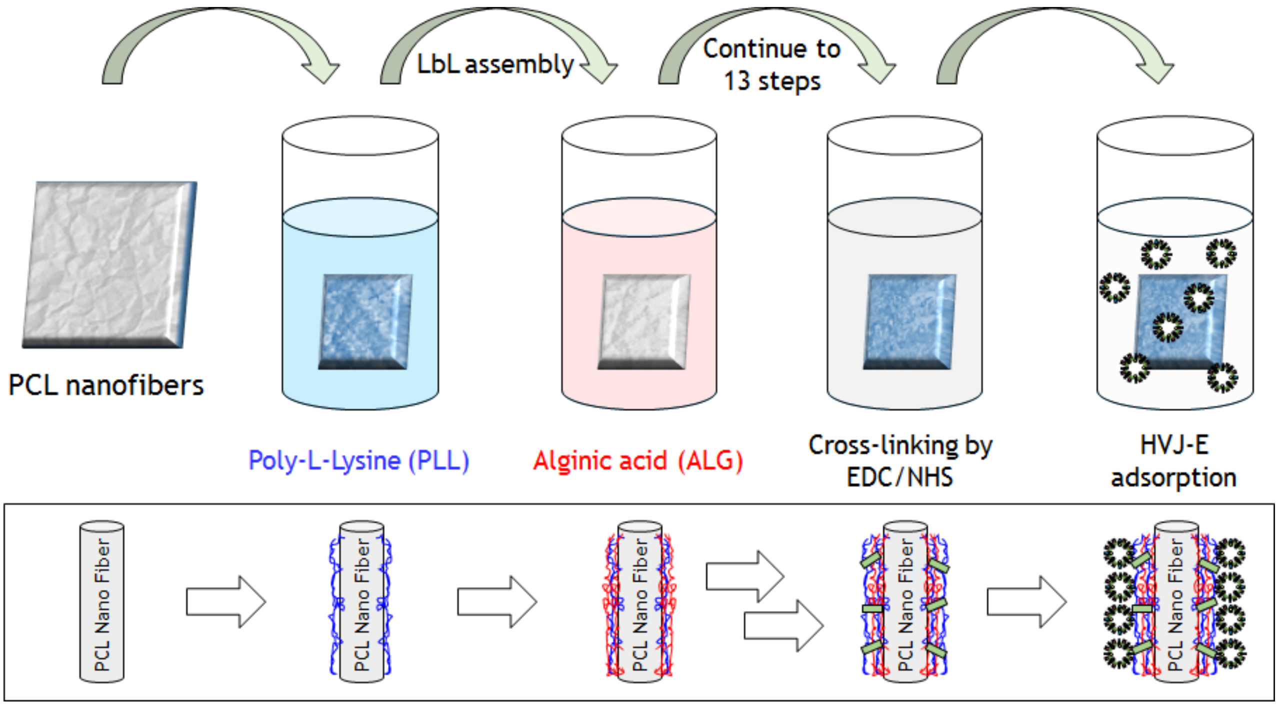

Figure 3.7. PCL ナノファイバー上への LbL 修飾と HVJ-E 吸着の概念図

細胞培養液中でのナノファイバー上の LbL 膜の安定性を維持するため、LbL 膜中の PLL のアミノ基、および ALG のカルボン酸を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) と N-hydroxysuccinimide (NHS) を用いて化学架橋した。EDC と NHS をそれぞれ HEPES/NaCl 溶液に溶解し、それぞれの溶液濃度を 800 mM と 200 mM に調整した。EDC と NHS の溶液を混合し、その溶液に PLL 最外層を有する LbL 修飾 PCL ナノファイバーを浸漬させた。このナノファイバー含有溶液を 4 ℃ で 4 時間インキュベートし、PLL と ALG の高分子架橋反応を行った。反応後、HEPES/NaCl 溶液で余剰物質を除去した。高分子の架橋反応は、Perkin-Elmer 社製の測定装置 (Perkin-Elmer Spectrum One, Perkin-Elmer) で FTIR スペクトルを測定し、評価した。

3.3.4. HVJ-E の LbL 修飾ナノファイバー上への固定化

石原産業株式会社より購入した凍結 HVJ-E (GE-016) 溶液 1 本をデシケーター内で溶解し、3.75 mL の HEPES/NaCl 溶液で溶解した。前述した PLL を最外層に有する LbL 修飾ナノファイバーを HVJ-E 溶液に 2 時間浸漬させた。HVJ-E 吸着後、HEPES/NaCl 溶液にて、余剰 HVJ-E を除去した。

3.3.5. HVJ-E 固定化ナノファイバーの観察

・走査型電子顕微鏡（SEM）およびレーザー電子顕微鏡（SLM）による観察

作製した PCL ナノファイバー、LbL 修飾ナノファイバー、および HVJ-E 修飾ナノファイバーをレーザー電子顕微鏡 (VK9-9700G, Keyence) で評価した。また、同サンプルをプラチナコーティン

グし、走査型電子顕微鏡 (SU-8000, Hitachi) を用いて観察した。

・共焦点顕微鏡による観察

FITC ラベル化した PLL と ALG の LbL 修飾を PCL ナノファイバー上に修飾した。EDC/NHS による化学架橋後、pKH-26 でラベル化した HVJ-E を PLL 最表面の PCL ナノファイバー表面に吸着させた。HVJ-E と LbL 膜のナノファイバーメッシュ内部への浸潤を、共焦点顕微鏡 (SP-5, Leica) を用いて評価した。

3.3.6. HVJ-E の LbL 修飾表面からの徐放量の定量

1 cm× 1cm の HVJ-E 修飾ナノファイバー切片を 5 mL の PBS 溶液に浸漬させた。溶液を 37 ºC、55 回 / min の攪拌機にて所定時間攪拌した。1 mL のナノファイバー浸漬溶液を取り出し、280 nm の吸光度を紫外分光光度計 (V-650, JASCO) にて測定し､溶液の HVJ-E 濃度を検量線より算出した。

3.3.7. 徐放 HVJ-E による細胞傷害性試験

24 well プレート内にヒト前立腺癌細胞 PC-3 を 10,000 cells / well の濃度で播種し、37 ºC のインキュベーターで 24 時間前培養した。各 well 内に 1 cm× 1cm の PCL ナノファイバー、LbL 修飾ナノファイバー、HVJ-E 修飾 LbL ナノファイバーをそれぞれ添加し、72 時間培養した。24 時間ごとに 50 µL の Cell Counting Kit-8（DOJIN chemical, Kyoto）を加え、2 時間培養したのち、450nm の吸光度を測定し、細胞傷害性を評価した。

3.4. 結果と考察

3.4.1. PCL ナノファイバーの作製とその LbL 修飾

本研究では、HVJ-E の吸着足場材として、PCL を原材料とするナノファイバー利用した。PCL はアメリカ食品医薬品局 (FDA) により認可されており、医療臨床試験にも応用が期待される生分解性高分子である。PCL を用いた生体材料研究は、組織工学やドラッグデリバリーなど様々な分野に応用されてきた [30–32]。

はじめに電界紡糸法を用いて PCL ナノファイバーを作製した [24,29]。作製した PCL ナノファイバー上に、LbL 法を用いて高分子積層膜を作製した。一般的に LbL 膜の表面電位は最外層に利用した高分子の電荷に由来する [33,34]。第 2 章で検討した通り、HVJ-E は生理条件下においてはアニオン電荷を有する粒子 [35] であるため、LbL 膜の最外層はカチオン性高分子である PLL とした。得られた LbL 修飾ナノファイバーの LbL 膜間を EDC と NHS を用いて架橋し、FTIR スペクトルで架橋反応を確認した (Figure 3.8)。

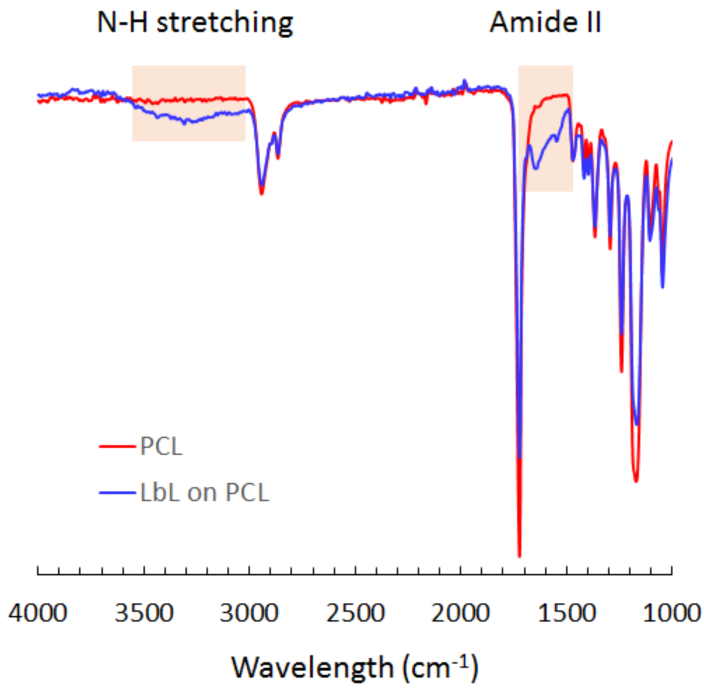

Figure 3.8. PCL ナノファイバーと LbL 修飾ナノファイバーの FTIR スペクトル [26]

Picart らの研究によれば、LbL 膜間の高分子架橋反応の反応率は EDC と NHS の量、および反応時間や温度に影響を受ける [36,37]。高分子の架橋率を精密にコントロールすることで、細胞の吸着や分化がコントロールされる。

FTIR のスペクトルより、3200-3400 cm^{-1} と 1515-1600 cm^{-1} の波長にそれぞれ N-H stretching、および二級アミドのピークが確認された。本研究にて利用した PLL のアミノ基と ALG のカルボン酸の架橋反応後に生じる二級アミドが、本スペクトル測定により確認された。この結果から、LbL 膜がナノファイバー上に積層、および架橋反応の進行が確認された。

3.4.2 HVJ-E の吸着とその評価

・<u>液滴滴下試験</u>

HVJ-E の LbL 膜表面への吸着を確認するため、作製した HVJ-E 吸着ナノファイバーの濡れ性を、ナノファイバー上への液滴滴下により評価した。PCL ナノファイバーは疎水性高分子である PCL から作製されるため、液滴の球形が維持された (Figure 3.9 左) 。一方、HVJ-E を修飾した PCL ナノファイバー上では、液滴は瞬時に広がり、球状を維持できなかった (Figure 3.9 右) 。HVJ-E は親水性の膜タンパク質をエンベロープ膜表面に多量に有している [38]。親水性膜タンパク質が多量に表面に蓄積した影響で、PCL ナノファイバーの親水性が上昇したと考えられる。

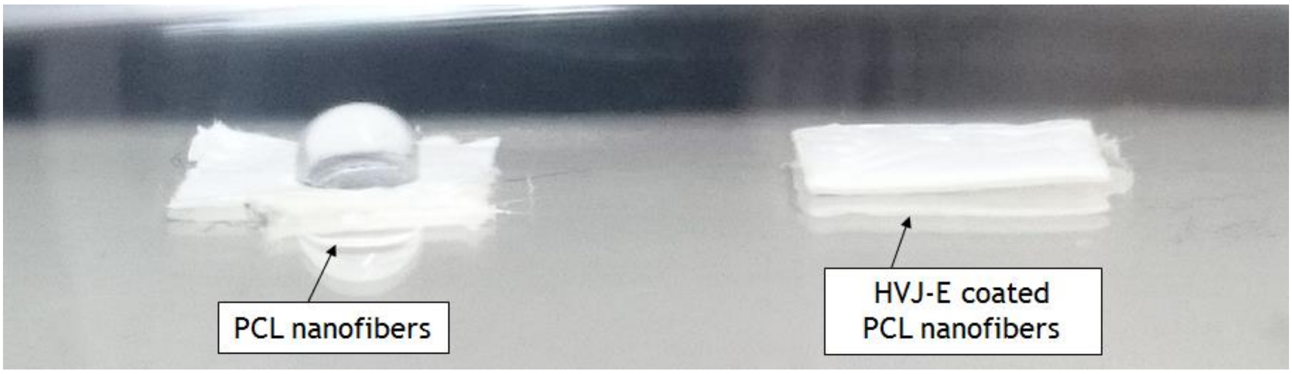

Figure 3.9. （左）PCL ナノファイバーと（右）HVJ-E 修飾ナノファイバーの濡れ性評価 [26]

・<u>電子顕微鏡による表面観察</u>

次に、PCL ナノファイバー、LbL 修飾ナノファイバーおよび HVJ-E 修飾ナノファイバーをレーザー電子顕微鏡 (SLM) および走査型電子顕微鏡 (SEM) により評価した (Figure 3.10)。

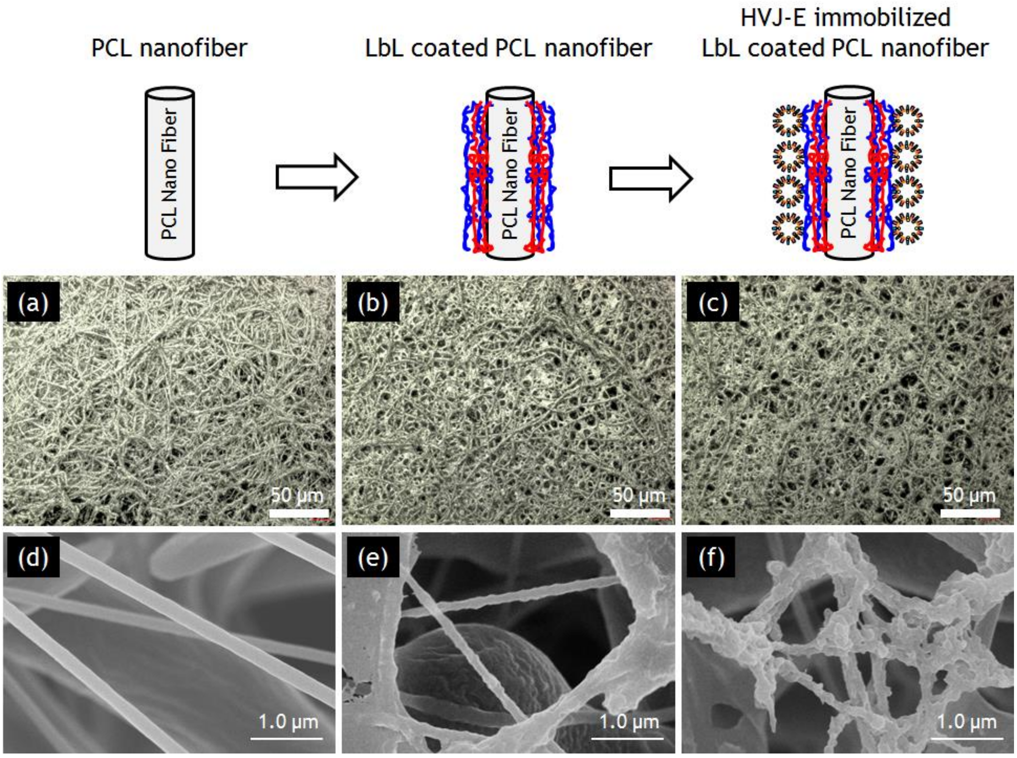

Figure 3.10. レーザー光学顕微鏡 (SLM) による (a) PCL ナノファイバー (b) LbL 修飾 PCL ナノファイバー (c) HVJ-E 修飾ナノファイバーの観察と、走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察 (d-f)[26]

SLM の観察では、表面のナノファイバーの形状は PCL ナノファイバー (Figure 3.10 a)、LbL コート PCL ナノファイバー (Figure 3.10 b)、HVJ-E 吸着 PCL ナノファイバー (Figure 3.10 c) いずれの場合も、ナノファイバーの形状を維持していることが確認された。一方、LbL 膜を修飾したナノファイバーでは、ナノファイバー間の LbL 膜による架橋も観察された (Figure 3.10 b) 。

ナノファイバーの形状を SEM により詳細に観察すると、未修飾 PCL ナノファイバーでは、１本

1 本のナノファイバーがきれいに観察される (Figure 3.10 d) のに対し、LbL 修飾では表面がやや凹凸がみられる (Figure 3.10 e) 。さらに HVJ-E 修飾ナノファイバーでは表面上に凹凸が確認された。HVJ-E の粒径は約 200 nm であり、ナノファイバー上に固定化された場合、表面凹凸が観察されるはずである。例えば AFM により基板上に HVJ-E を固定化した場合においても、表面上に凹凸が確認される [39]。つまり、Figure 3.10 (f) で確認された凹凸は、ナノファイバー上への HVJ-E の吸着と考えられる。これらの観察結果より、ナノファイバー上への HVJ-E 吸着が強く示唆される。

・共焦点顕微鏡による観察

ナノファイバーの長所の一つとして、二次元平面と比較し、非常に大きな表面積を有する点が挙げられる [40]。すなわち、より多くの生理活性物質（HVJ-E など）をその表面上に固定化することが可能である。しかしながら、ナノファイバーメッシュの表面だけでなく、内部に存在するナノファイバー上にまで LbL 膜が形成されていなければ、その利点を最大限に活かすことが出来ない。そこで今回作製した LbL 膜が、ナノファイバーメッシュ最表面に局在せず、ナノファイバーメッシュ内部のファイバー上にまでコーティングされているかどうかを確認するため、共焦点顕微鏡によりその評価を行った (Figure 3.11)。

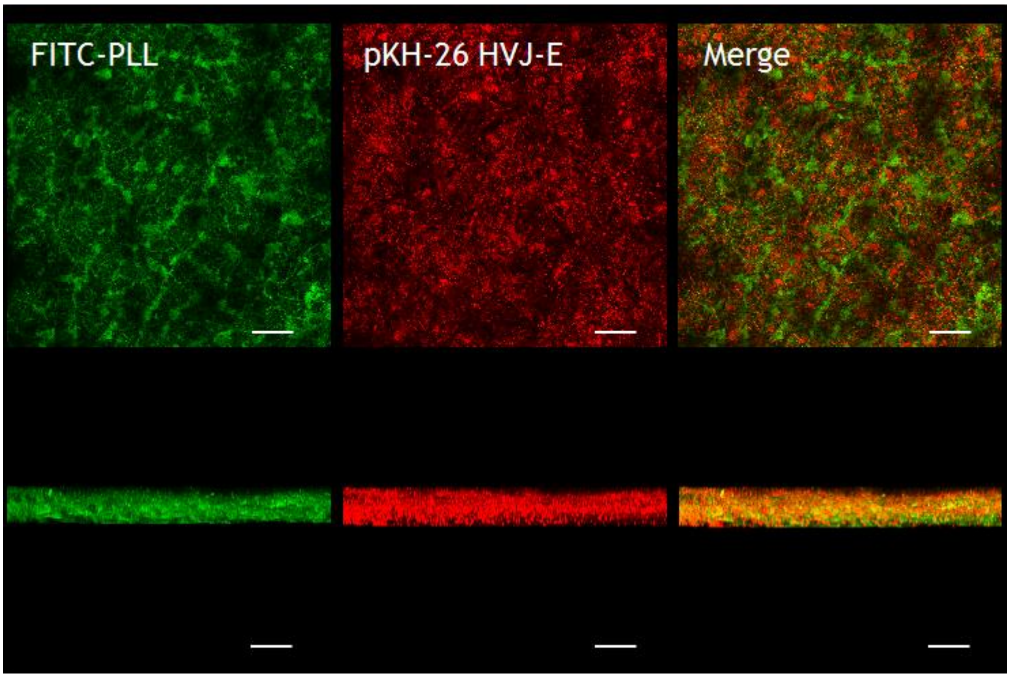

Figure 3.11. 共焦点顕微鏡による pKH-26 ラベル化 HVJ-E (red) を吸着させた FITC-PLL (green) と ALG の LbL 膜の観察。XY 平面の観察（上）と Z スキャン（下）の観察。(Scale bars = 50 μm)

FITC により緑色蛍光ラベル化した PLL と ALG をナノファイバー上に LbL 修飾し、作製した LbL 膜上に pKH-26 により赤色蛍光ラベル化した HVJ-E を吸着させた。作製した HVJ-E 吸着ナノファイバーを共焦点顕微鏡により観察した。

XY 平面の観察では FITC と pKH-26 の蛍光色素の表面が形成されていることが観察された (Figure 3.11 上) 。一方、Z 軸方向のスキャンでは、緑色・赤色いずれの蛍光色素も、最表面のみならず内部にまで吸着していることが観察された (Figure 3.11 下) 。この実験結果から、ナノファイ

バーメッシュ内部においても LbL 膜、および HVJ-E がナノファイバー上への吸着していることが確認された。

3.4.3. HVJ-E のナノファイバーからの徐放

HVJ-E のナノファイバーからの徐放は 37 ºC、Dulbecco's リン酸緩衝液中で行い、徐放された HVJ-E 量を UV-vis を用いて評価した (Figure 3.12) 。

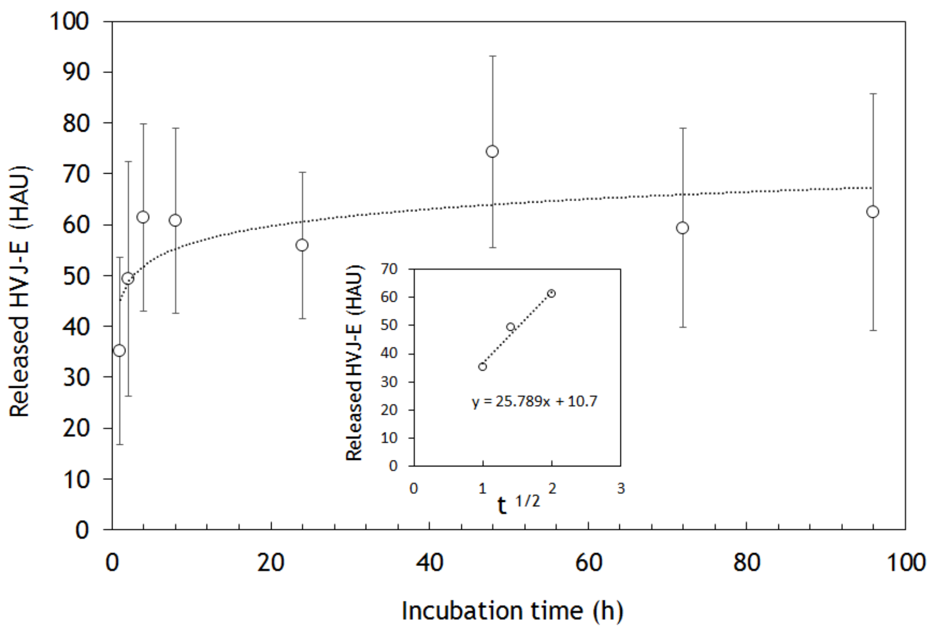

Figure 3.12. 生理条件下 (PBS, 37 ºC) における HVJ-E のナノファイバーからの徐放

HVJ-E の LbL 膜上への吸着は HEPES/NaCl 緩衝液中で 25 ºC にて行った。静電相互作用による吸着は、イオン濃度の変化や溶液の温度に影響を受け、吸着や脱着が促進される。ヒト生理条件下を模倣した Dulbecco's リン酸緩衝液中においては、LbL 積層中の溶液とイオン種が異なり、更に 37 ºC の温度においてはイオン交換反応の促進が考えられる [41]。そのため、HVJ-E は速やかに脱離すると考えられた。

HVJ-E の徐放は PBS 溶液浸漬後速やかに始まり、8 時間後には約 60 HAU の HVJ-E が徐放された。HVJ-E の徐放量は時間の平方根に比例し直線的であった。樋口らの報告によれば、高分子電解質マトリックス内部からの薬物放出は時間の平方根に比例するとされており [42,43]、本研究で得られた結果は、LbL 膜の物理的崩壊で生じるものではなく、静電相互作用での塩置換反応による放出であると考察される。

3.4.4. HVJ-E 徐放ファイバーの細胞毒性

最後に、作製した HVJ-E 徐放ナノファイバーが癌細胞に対し毒性を示すかどうかを細胞実験により評価した。本実験では、ヒト前立腺癌細胞 PC-3 を試験細胞として利用した。PC-3 は HVJ-E

の受容体を有し、HVJ-E が融合することでアポトーシスをすることが Kawaguchi らにより報告されている [44]。この PC-3 細胞 (10,000 cells/well) の培養液中に 1 cm × 1 cm 角の PCL ファイバー、LbL 修飾 PCL ファイバーと HVJ-E 吸着ファイバーをそれぞれ加え、24〜72 時間共培養した。培養後、Cell counting kit-8 を加え、生細胞から合成されるホルマザンを、450 nm の吸光度を測定することにより評価し、Figure 3.13 (a) にまとめた。

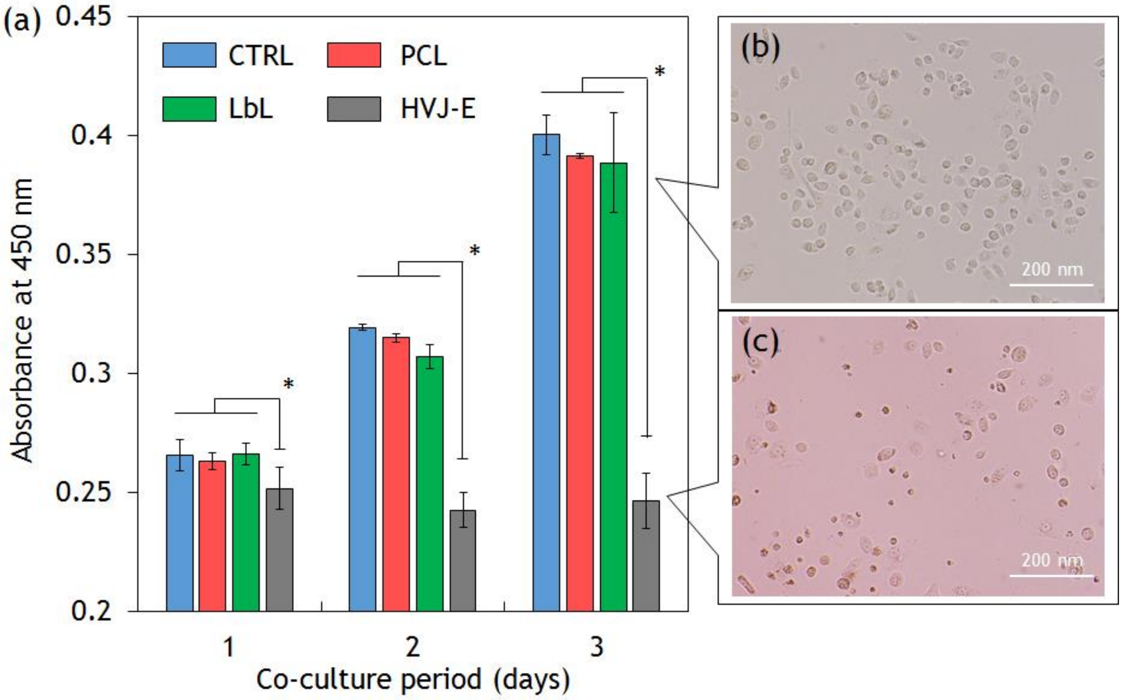

Figure 3.13. (a) HVJ-E ナノファイバーの抗腫瘍効果の検討。ヒト前立腺癌細胞と PCL ナノファイバー (PCL)、LbL 修飾ナノファイバー (LbL)、HVJ-E 修飾ナノファイバー (HVJ-E) を加えて共培養した後、CCK アッセイにより細胞生存率を検討した（CTRL はファイバー未添加）, 光学顕微鏡による (b) CTRL と (c) HVJ-E ファイバーを加えた細胞の観察

生細胞の数は CTRL (ファイバー未添加)、PCL ファイバー (PCL)、LbL 修飾ファイバー(PLL) を加えたいずれの場合でも 72 時間増加し続け、生細胞由来のホルマザン量に有意差は見られなかった (Figure 3.13 a) 。この結果は、PCL ナノファイバーや PLL 最外層の LbL 膜が細胞に対し毒性を発現しないことを示している。一方で、HVJ-E 吸着ファイバーは細胞の増殖を 72 時間抑制し続けただけでなく、その細胞数の減少に寄与した。光学顕微鏡による観察でも、CTRL の細胞 (Figure 3.13 b) と比較し、顕微鏡でも死細胞が観察された (Figure 3.13 c) 。つまり、固定化・徐放された HVJ-E が癌細胞に細胞死を誘導していることが示された。

第 1 章でも述べた通り、HVJ-E は他の免疫細胞の作用なしに、腫瘍細胞に選択的にアポトーシスを誘導させる能力を有する。その作用機序として、HVJ-E 内部の RNA 断片が大きく寄与することがこれまでの知見として知られている。HVJ-E の表面タンパク質である HN タンパク質は、細胞表面のシアル酸の一種である GD1a を認識し、HVJ-E がその表面に選択的に吸着することを補助する [44]。細胞への吸着後、タンパク質の改変に伴い、F タンパク質が細胞の脂質二分子膜に融合し、細胞融合が起こる [45]。細胞融合ののち、不活性化のプロセスにより生じた HVJ-E 内部の残存 RNA 断片が、細胞質において RIG-I 受容体により認識される [46]。RIG-I 受容体により認識されると、RIG-

I/MAVS 経路が活性化され、TRAIL の発現を誘導する。TRAIL リガンドは TNF レセプター（TNF-R)と結合することで細胞に細胞死を誘導する [47–49]。TNF-R は TNF-R1~R5 までが存在し、TNF-R4 と TNF-R5 が細胞死を誘導する Death Domain (DD) を有する。TNF-R4 と TNF-R5 は腫瘍細胞に多く発現していることから、HVJ-E の感染により誘導された TRAIL リガンドの発現が、腫瘍細胞の TNF-R に結合することで癌細胞選択的にアポトーシスを誘導することができると考えられる。これらの事実を考慮すると、今回得られた結果は、HVJ-E がナノファイバー上に固定化された後も、活性を有し、更に徐放された HVJ-E が、細胞にアポトーシスを誘導することを示す結果である（Figure 3.14)。

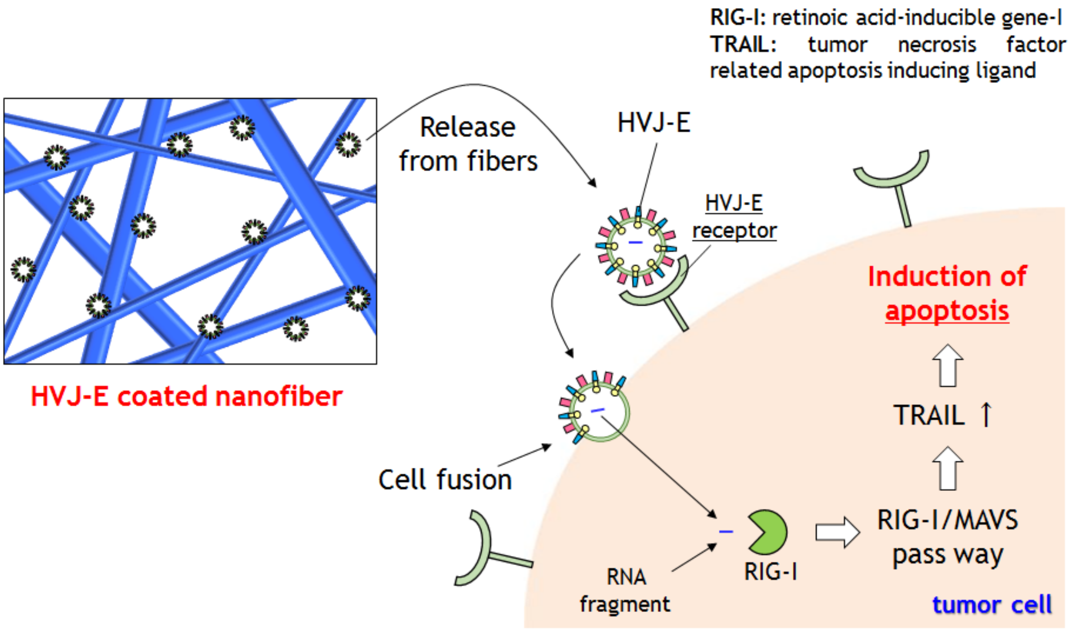

Figure 3.14. HVJ-E 修飾ナノファイバーのアポトーシス誘導メカニズム

3. 5.　結言

本章では、ナノファイバー表面に HVJ-E を固定化し、その評価と抗腫瘍効果を確認した。PLL と ALG から構成される LbL 膜の架橋反応は FTIR 測定により観察された。アニオン電荷を有する HVJ-E の固定化は、カチオン性高分子である PLL を最外層に有する LbL 膜上に静電相互作用を用いて行った。SLM と SEM による観察で、HVJ-E のナノファイバー上への固定化が確認された。また HVJ-E は、ナノファイバーメッシュの最表面のみならず、ナノファイバーメッシュ内部のファイバー上にも固定化されていることが、共焦点顕微鏡による観察において確認された。固定化された HVJ-E はヒト生理条件下を模倣した環境で速やかに徐放し、8 時間後には 1 cm×1 cm 片のファイバーから約 60 HAU の HVJ-E が徐放された。更に、作製した HVJ-E 徐放ナノファイバーは 3 日間にわたり前立腺癌細胞 PC-3 の増殖を抑制した。この結果は、HVJ-E の抗腫瘍活性を損なうことなく、その表面への固定化が実現できたことを示している。

ナノファイバーは磁性粒子や抗癌剤がその内部に内包可能であることがこれまでの研究から明らかとなっている。本 HVJ-E 固定化技術と内包した磁性粒子・抗癌剤を組み合わせることで、化学・温熱・免疫いずれの治療法も同時に、任意のタイミングで実現可能な新規デバイスの開発が実現可能となるであろう。

3. 6. 参考文献

(1) 厚生労働省大臣官房統計情報部編. 人口動態統計によるがん死亡データ（1958年～2014年）. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」.

(2) 国 立 研 究 開 発 法 人 国 立 が ん 研 究 セ ン タ ー . 2015 年 の が ん 罹 患 数 、 死 亡 数 予 測（http://www.ncc.go.jp/jp/information/pdf/press_release_20150428.pdf）.

(3) Nicolai, P.; Battaglia, P.; Bignami, M.; Bolzoni Villaret, A.; Delù, G.; Khrais, T.; Lombardi, D.; Castelnuovo, P. Endoscopic Surgery for Malignant Tumors of the Sinonasal Tract and Adjacent Skull Base: A 10-Year Experience. *Am. J. Rhinol.* **2011**, *22*, 308–316.

(4) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from Taxus Brevifolia. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *93*, 2325–2327.

(5) Baum, S. G.; Wittner, M.; Nadler, J. P.; Horwitz, S. B.; Dennis, J. E.; Schiff, P. B.; Tanowitz, H. B. Taxol, a Microtubule Stabilizing Agent, Blocks the Replication of Trypanosoma Cruzi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 4571–4575.

(6) Lai, P. P.; Perez, C. A.; Shapiro, S. J.; Lockett, M. A. Carcinoma of the Prostate Stage B and C: Lack of Influence of Duration of Radiotherapy on Tumor Control and Treatment Morbidity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1990**, *19*, 561–568.

(7) Barillot, I.; Horiot, J. C.; Pigneux, J.; Schraub, S.; Pourquier, H.; Daly, N.; Bolla, M.; Rozan, R. Carcinoma of the Intact Uterine Cervix Treated with Radiotherapy Alone: A French Cooperative Study: Update and Multivariate Analysis of Prognostics Factors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1997**, *38*, 969–978.

(8) Vaidya, M.; Creach, K. M.; Frye, J.; Dehdashti, F.; Bradley, J. D.; El Naqa, I. Combined PET/CT Image Characteristics for Radiotherapy Tumor Response in Lung Cancer. *Radiother. Oncol.* **2012**, *102*, 239–245.

(9) Yamamoto, T.; Nakai, K.; Matsumura, A. Boron Neutron Capture Therapy for Glioblastoma. *Cancer Lett.* **2008**, *262*, 143–152.

(10) Johnsson, M.; Bergstrand, N.; Edwards, K. Optimization of Drug Loading Procedures and Characterization of Liposomal Formulations of Two Novel Agents Intended for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *J. Liposome Res.* **1999**, *9*, 53–79.

(11) Thirumamagal, B. T. S.; Zhao, X. B.; Bandyopadhyaya, A. K.; Narayanasamy, S.; Johnsamuel, J.; Tiwari, R.; Golightly, D. W.; Patel, V.; Jehning, B. T.; Backer, M. V.; et al. Receptor-Targeted Liposomal Delivery of Boron-Containing Cholesterol Mimics for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 1141–1150.

(12) Barth, R. F.; Yang, W.; Wu, G.; Swindall, M.; Byun, Y.; Narayanasamy, S.; Tjarks, W.; Tordoff, K.; Moeschberger, M. L.; Eriksson, S.; et al. Thymidine Kinase 1 as a Molecular Target for Boron Neutron

Capture Therapy of Brain Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 17493–17497.

(13) Sumitani, S.; Oishi, M.; Yaguchi, T.; Murotani, H.; Horiguchi, Y.; Suzuki, M.; Ono, K.; Yanagie, H.; Nagasaki, Y. Pharmacokinetics of Core-Polymerized, Boron-Conjugated Micelles Designed for Boron Neutron Capture Therapy for Cancer. *Biomaterials* **2012**, *33*, 3568–3577.

(14) Katschinski, M.; Robins, H. I.; Schad, M.; Frede, S.; Fandrey, J.; Lu, D. Role of Tumor Necrosis Factor α in Hyperthermia-Induced Apoptosis of Human Leukemia Cells Do. *Cancer Res.* **1999**, 3404–3410.

(15) Lord-Fontaine, S.; Averill, D. A. Enhancement of Cytotoxicity of Hydrogen Peroxide by Hyperthermia in Chinese Hamster Ovary Cells: Role of Antioxidant Defenses. *Arch Biochem Biophys* **1999**, *363*, 283–295.

(16) Hurwitz, M. D.; Hansen, J. L.; Prokopios-Davos, S.; Manola, J.; Wang, Q.; Bornstein, B. A.; Hynynen, K.; Kaplan, I. D. Hyperthermia Combined with Radiation for the Treatment of Locally Advanced Prostate Cancer. *Cancer* **2011**, *117*, 510–516.

(17) Tran, N.; Webster, T. J. Magnetic Nanoparticles: Biomedical Applications and Challenges. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 8760–8767.

(18) Hu, S.; Liao, B.; Chiang, C.; Chen, P.; Chen, I.; Chen, S. Core-Shell Nanocapsules Stabilized by Single-Component Polymer and Nanoparticles for Magneto-Chemotherapy / Hyperthermia with Multiple Drugs. **2012**, 3627–3632.

(19) Kim, Y.-J.; Ebara, M.; Aoyagi, T. A Smart Hyperthermia Nanofiber with Switchable Drug Release for Inducing Cancer Apoptosis. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 5753–5761.

(20) Kurooka, M.; Kaneda, Y. Inactivated Sendai Virus Particles Eradicate Tumors by Inducing Immune Responses through Blocking Regulatory T Cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 227–236.

(21) Suzuki, H.; Kurooka, M.; Hiroaki, Y.; Fujiyoshi, Y.; Kaneda, Y. Sendai Virus F Glycoprotein Induces IL-6 Production in Dendritic Cells in a Fusion-Independent Manner. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 1325–1329.

(22) Kawano, H.; Komaba, S.; Kanamori, T.; Kaneda, Y. A New Therapy for Highly Effective Tumor Eradication Using HVJ-E Combined with Chemotherapy. *BMC Med.* **2007**, *5*, 28.

(23) Fujii, H.; Matsuyama, A.; Komoda, H.; Sasai, M.; Suzuki, M.; Asano, T.; Doki, Y.; Kirihata, M.; Ono, K.; Tabata, Y.; et al. Cationized Gelatin-HVJ Envelope with Sodium Borocaptate Improved the BNCT Efficacy for Liver Tumors in Vivo. *Radiat. Oncol.* **2011**, *6*, 8.

(24) Garrett, R.; Niiyama, E.; Kotsuchibashi, Y.; Uto, K.; Ebara, M. Biodegradable Nanofiber for Delivery of Immunomodulating Agent in the Treatment of Basal Cell Carcinoma. *Fibers* **2015**, *3*, 478–490.

(25) 栗本理央; 高井僚; 小土橋陽平; 荏原充宏. 災害時に透析患者を救うナノファイバーの開発, Web Journal 2015, 10月号, 7–9.

(26) Okada, T.; Niiyama, E.; Uto, K.; Aoyagi, T.; Ebara, M. Inactivated Sendai Virus (HVJ-E) Immobilized Electrospun Nanofiber for Cancer Therapy. *Materials* **2016**, *9*, 12.

(27) Lvov, Y.; Haas, H.; Decher, G.; Moehwald, H.; Mikhailov, A.; Mtchedlishvily, B.; Morgunova, E.; Vainshtein, B. Successive Deposition of Alternate Layers of Polyelectrolytes and a Charged Virus. *Langmuir* **1994**, *10*, 4232–4236.

(28) Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232–1237.

(29) Ebara, M.; Uto, K.; Idota, N.; Hoffman, J. M.; Aoyagi, T. Shape-Memory Surface with Dynamically Tunable Nanogeometry Activated by Body Heat. *Adv. Mater.* **2012**, 273–278.

(30) Coombes, A. G. A.; Rizzi, S. C.; Williamson, M.; Barralet, J. E.; Downes, S.; Wallace, W. A. Precipitation Casting of Polycaprolactone for Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. *Biomaterials* **2004**, *25*, 315–325.

(31) Rai, B.; Teoh, S. H.; Hutmacher, D. W.; Cao, T.; Ho, K. H. Novel PCL-Based Honeycomb Scaffolds as Drug Delivery Systems for rhBMP-2. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3739–3748.

(32) Uto, K.; Ebara, M.; Aoyagi, T. Temperature-Responsive Poly(ε-Caprolactone) Cell Culture Platform with Dynamically Tunable Nano-Roughness and Elasticity for Control of Myoblast Morphology. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 1511–1524.

(33) De Geest, B. G.; Willart, M. a; Lambrecht, B. N.; Pollard, C.; Vervaet, C.; Remon, J. P.; Grooten, J.; De Koker, S. Surface-Engineered Polyelectrolyte Multilayer Capsules: Synthetic Vaccines Mimicking Microbial Structure and Function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 3862–3866.

(34) Guo, X. M.; Guo, B.; Zhang, Q.; Sun, X. Absorption of 10-Hydroxycamptothecin on Fe3O4 Magnetite Nanoparticles with Layer-by-Layer Self-Assembly and Drug Release Response. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 3039–3046.

(35) Okada, T.; Uto, K.; Sasai, M.; Lee, C. M.; Ebara, M.; Aoyagi, T. Nano-Decoration of the Hemagglutinating Virus of Japan Envelope (HVJ-E) Using a Layer-by-Layer Assembly Technique. *Langmuir* **2013**, 7384–7392.

(36) Ren, K.; Crouzier, T.; Roy, C.; Picart, C. Polyelectrolyte Multilayer Films of Controlled Stiffness Modulate Myoblast Cells Differentiation. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 1378–1389.

(37) Crouzier, T.; Ren, K.; Nicolas, C.; Roy, C.; Picart, C. Layer-by-Layer Films as a Biomimetic Reservoir for rhBMP-2 Delivery: Controlled Differentiation of Myoblasts to Osteoblasts. *Small* **2009**, *5*, 598–608.

(38) Communie, G.; Crépin, T.; Maurin, D.; Jensen, M. R.; Blackledge, M.; Ruigrok, R. W. H. Structure of the Tetramerization Domain of Measles Virus Phosphoprotein. *J. Virol.* **2013**, *87*, 7166–7169.

(39) Okada, T.; Uto, K.; Aoyagi, T.; Ebara, M. A Biomimetic Approach to Hormone Resistant Prostate Cancer Cell Isolation Using Inactivated Sendai Virus (HVJ-E). *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 96–103.

(40) Namekawa, K.; Schreiber, M. T.; Aoyagi, T.; Ebara, M. Fabrication of Zeolite–polymer Composite Nanofibers for Removal of Uremic Toxins from Kidney Failure Patients. *Biomater. Sci.* **2014**, *2*, 674–679.

(41) Zhao, Z.; Yin, L.; Yuan, G.; Wang, L. Layer-by-Layer Assembly of Two Temperature-Responsive Homopolymers at Neutral pH and the Temperature-Dependent Solubility of the Multilayer Film. *Langmuir* **2012**, *28*, 2704–2709.

(42) Siepmann, J.; Peppas, N. A. Higuchi Equation: Derivation, Applications, Use and Misuse. *Int. J. Pharm.* **2011**, *418*, 6–12.

(43) Aznar, E.; Sancenón, F.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Stroeve, P.; Cano, J.; Amorós, P. Delivery Modulation in Silica Mesoporous Supports via Alkyl Chain Pore Outlet Decoration. *Langmuir* **2012**, *28*, 2986–2996.

(44) Kawaguchi, Y.; Miyamoto, Y.; Inoue, T.; Kaneda, Y. Efficient Eradication of Hormone-Resistant Human Prostate Cancers by Inactivated Sendai Virus Particle. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2478–2487.

(45) Kaneda, Y.; Nakajima, T.; Nishikawa, T.; Yamamoto, S.; Ikegami, H.; Suzuki, N.; Nakamura, H.; Morishita, R.; Kotani, H. Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) Envelope Vector as a Versatile Gene Delivery System. *Mol. Ther.* **2002**, *6*, 219–226.

(46) Matsushima-Miyagi, T.; Hatano, K.; Nomura, M.; Li-Wen, L.; Nishikawa, T.; Saga, K.; Shimbo, T.; Kaneda, Y. TRAIL and Noxa Are Selectively Upregulated in Prostate Cancer Cells Downstream of the RIG-I/MAVS Signaling Pathway by Nonreplicating Sendai Virus Particles. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 6271–6283.

(47) Thomas, W. D.; Hersey, P. TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Induces Apoptosis in Fas Ligand-Resistant Melanoma Cells and Mediates CD4 T Cell Killing of Target Cells. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 2195–2200.

(48) Wang, S.; El-Deiry, W. S. TRAIL and Apoptosis Induction by TNF-Family Death Receptors. *Oncogene* **2003**, *22*, 8628–8633.

(49) Zhang, X. D.; Franco, A.; Myers, K.; Gray, C.; Nguyen, T.; Hersey, P. Relation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Receptor and FLICE-Inhibitory Protein Expression to TRAIL-Induced Apoptosis of Melanoma Relation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Receptor and FLICE- Inhibitory Protein Expressi. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2747–2753.

第 4 章

基板固定化 HVJ-E を利用した
細胞分離方法の開発

4.1. 緒言

4.1.1. 循環腫瘍細胞の単離と研究

肺癌、前立腺癌、大腸癌など、上皮に形成される癌や浸潤性の高い腫瘍から遊離し、血液中を循環する循環腫瘍細胞 (CTCs ; Circulating tumor cells) の検出は、癌形成・転移に関する研究において非常に困難である。しかし、CTCs は血中濃度が非常に低く、進行性の癌の場合であっても、10 億の血中細胞に対し 1 つの CTCs という非常に低い割合であると見積もられている [1]。つまり、CTCs は癌の転移に重要な役割を果たしていると考えられている一方で、その単離や、研究のための細胞数確保が難しいといった課題があった。そのため、患者の血液成分から CTCs のみを単離、あるいは濃縮する技術を確立し、CTCs の有する性質を生物学的・科学的手法により解析する一連のプロセスの開発は非常に重要な課題である (Figure 4.1) 。

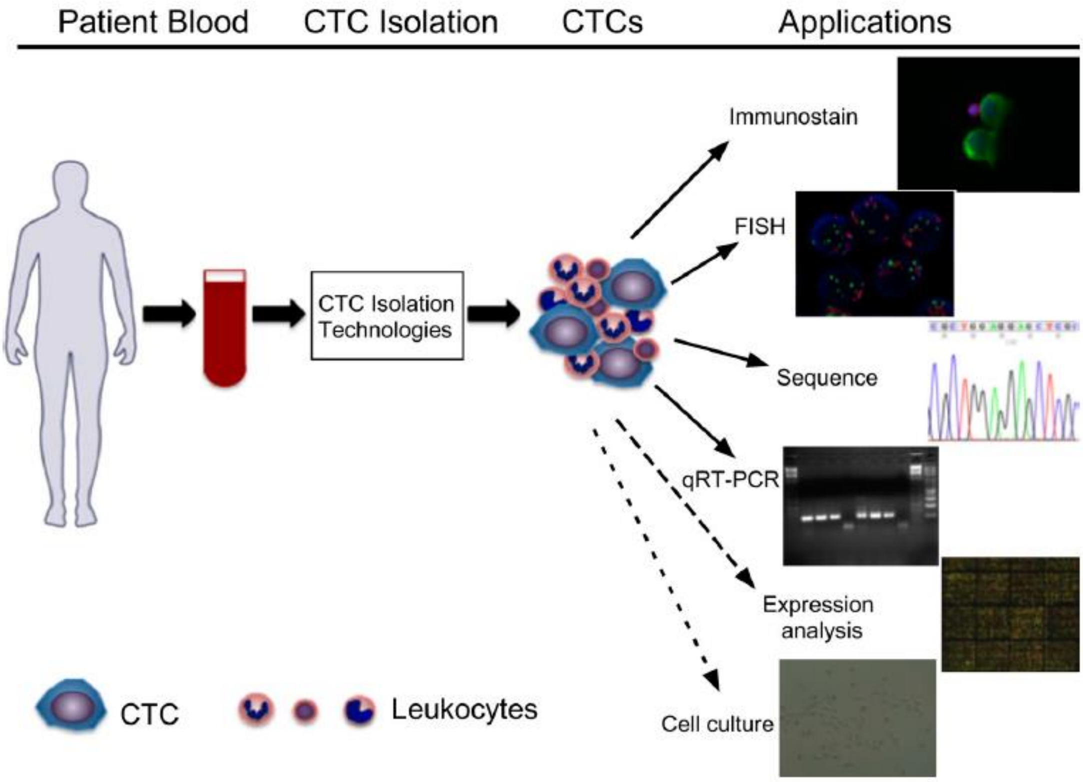

Figure 4.1. CTC の血液からの採取とその応用例 [1]

4.1.2. 幹細胞の分化と利用

2007 年に Takahashi, Yamanaka らによって報告された induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) はヒトの筋細胞などを遺伝子導入やタンパク質導入等によって改変し、作製される [2]。その革新性から、2012 年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。この iPS 細胞は、従来、再生医療研究の先駆的細胞であった、初期胚を用いて作製される embryonic stem cells (ES 細胞) [3–5] と比較し、倫理的問題を含まないことから、非常に注目を集めている。日本においても理化学研究所でヒト iPS 細胞を用いた

臨床研究がスタートしている。

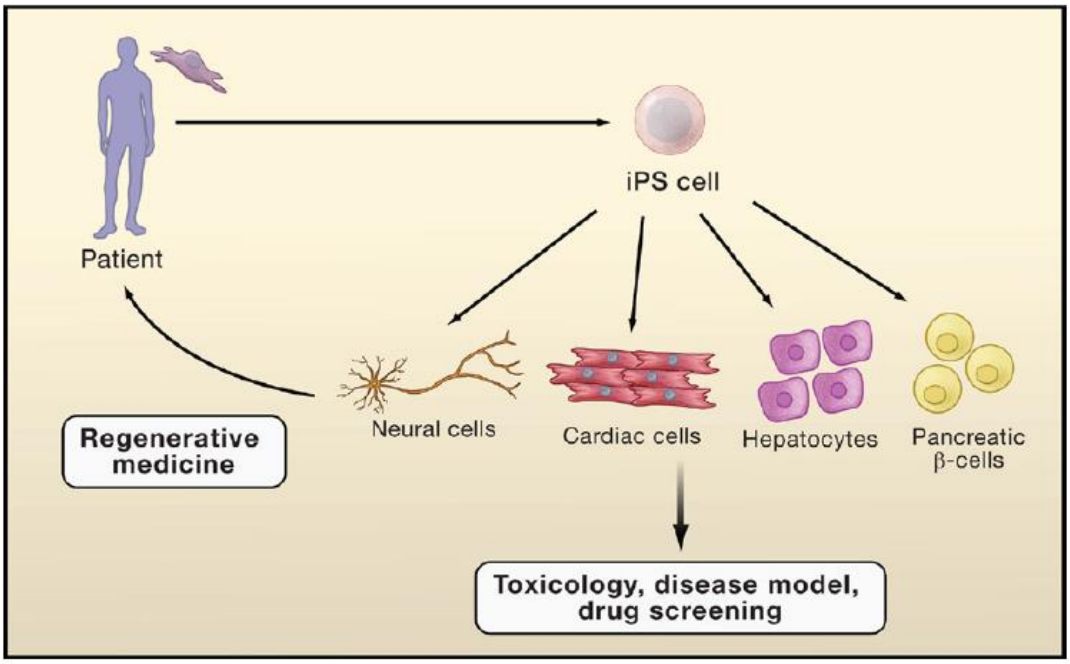

Figure 4.2. iPS 細胞の分化とその利用 [6]

iPS 細胞は、Neural cells、Cardiac cells、Hepatocytes、Pancreatic β-cells など、種々の細胞に分化する能力を有し、再生医療、組織工学や病気のモデル組織の作製、薬物のスクリーニングなどに用いられることが検討されている [6]。しかし細胞を利用するためには、分化の過程において生じる未分化の細胞や目的外細胞の除去が必要となるため、必要細胞の抽出、あるいはそれ以外を分離する必要がある。

4.1.3. 既存の細胞分離・濃縮方法

複数の細胞種から目的の細胞を取得する細胞分離の手法はこれまで数多くの研究が報告されてきた。例えば、細胞を蛍光色素にてラベル化した抗体でラベル化し、細胞をレーザーで認識し、蛍光強度を捕捉しながら目的細胞を分離する手法 (FACS : fluorescence activated cell sorting) は代表的な手法として有名である [7–10]。また、抗体を固定化させた磁性粒子を用いて、抗原抗体により結合した細胞を磁気によって分離する磁気分離という方法も提案されている [11,12]。

・<u>サイズによる細胞分離</u>

近年ではラベル化を用いない、サイズでふるいをかける方法も検討されている。Hosokawa らは、血液中に遊離した CTC の大きさが通常の細胞より大きいという性質を利用し、CTC を選択的に捕捉・濃縮可能な micro cavity array (MCA) を開発した [13,14] (Figure 4.3 a-c)

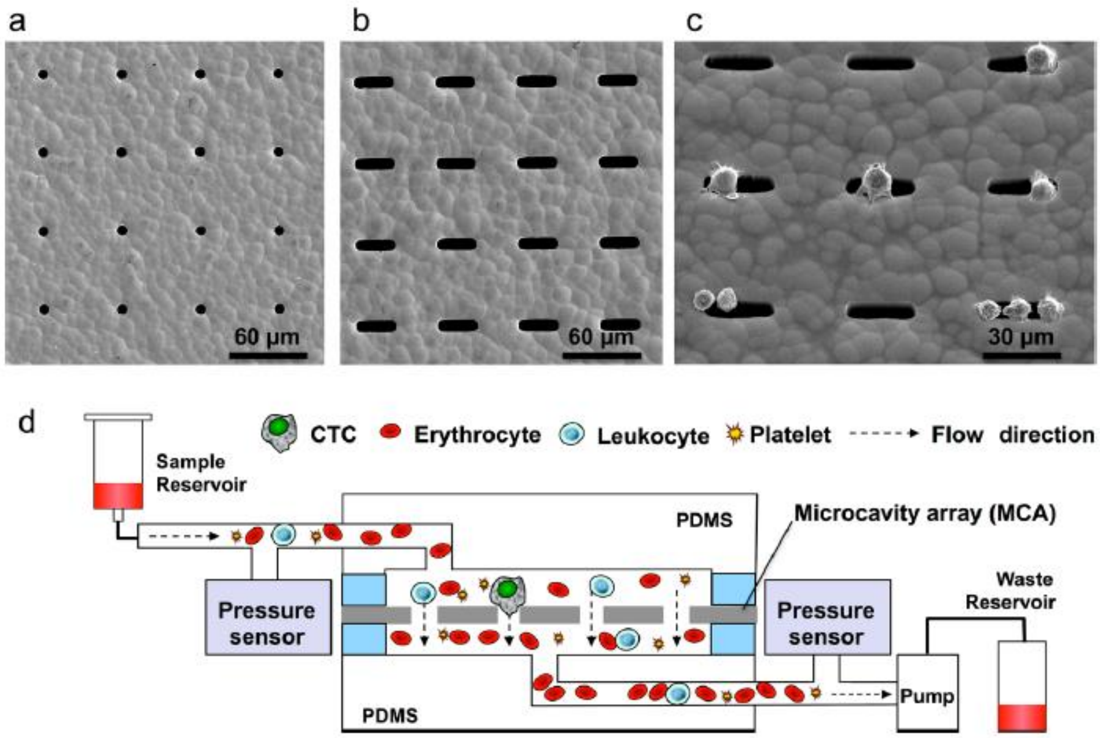

Figure 4.3. (a) Circular MCA , (b) rectangular MCA, (c) NCI-H69 CTC が吸着した rectangular MCA それぞれの SEM 画像と (d) CTC 濃縮デバイスの概念図 [14]

Rectangular MCA は基板表面に幅 5 ~ 9 μm, 長さが 30 μm の穴をあけることで、白血球や血小板、赤血球は穴を通過し、サイズの大きい CTC のみを穴に捕捉することを可能とした。さらにこの方法を応用し、自動的に CTC を濃縮する技術も報告されている (Figure 4.3 d) [15]。これらの手法では、高効率・短時間で CTC を分離することが可能である。

・抗体固相化による細胞分離

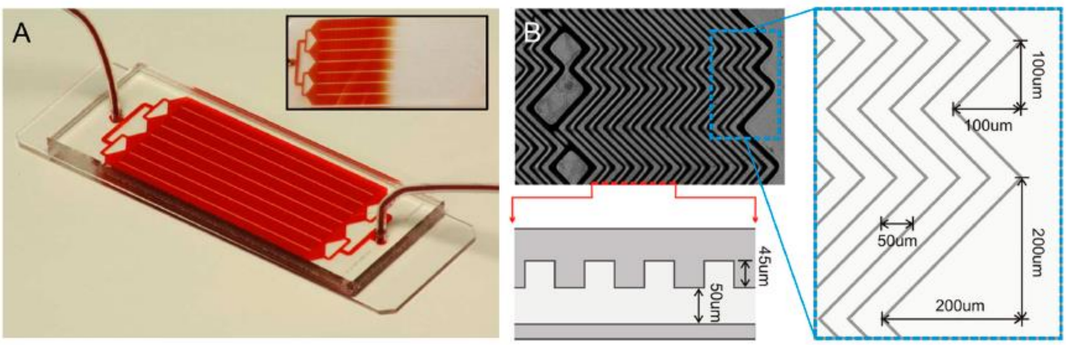

Figure 4.4. (A) 抗体を固定化させた CTCs 回収用マイクロチップ と (B) 基板の詳細な設計 [16].

Stott らは、マイクロチップ工学と抗原抗体反応を利用した CTCs 回収方法を考案した [16]。この方法では、CTCs を含む血液をチップ内に注入することで、基板の内部に固相化された抗体と CTCs の細胞表面が相互作用し、CTCs 以外の細胞が素早くチップ外に流出させる技術を開発した (Figure

4.4) 。この手法では、吸着した細胞の脱離が課題となっており、その課題を解決する方法として LbL 法によって作製した表面上に抗体を固定化する方法が Li らによって考案された[17]。

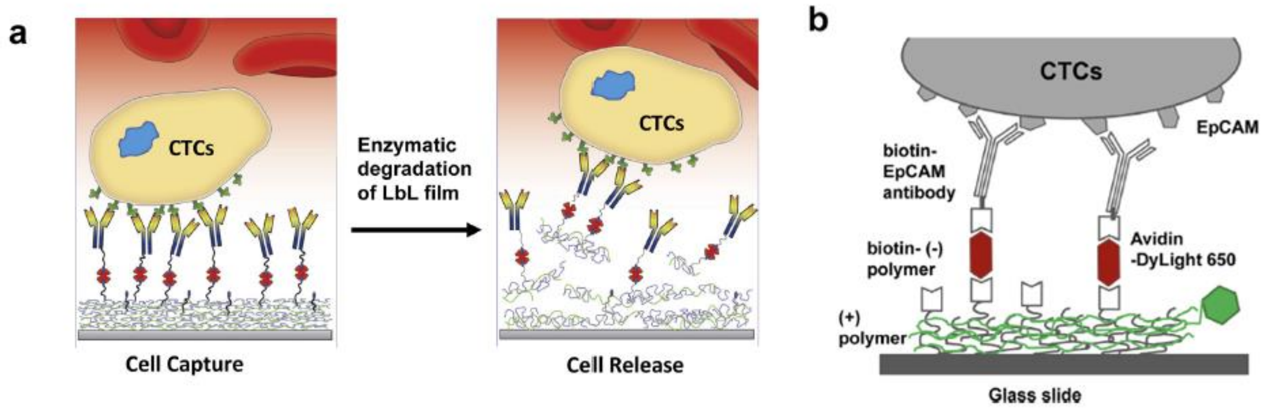

Figure 4.5. (a). LbL 膜上に固定化させた抗体による細胞捕捉と酵素分解と(b) LbL 膜と抗体の avidin-biotin の相互作用による固定化の概念図[17]

LbL 膜は生分解性高分子であるアルギン酸、ヒアルロン酸、Poly-L-Lysine から構成される。細胞をチップ内に流入後、所定時間 CTCs を吸着させる。その後、酵素分解反応により基板上の LbL 膜を分解し、その際に脱離した細胞を回収する方法である (Figure 4.5) 。この方法では、細胞を Trypsin 等で処理する必要がないため、より細胞に負荷をかけない回収方法として提案されている。

・カラムを用いた細胞分離

Mahara らは 0.5 mm の内径を有するシリコンチューブを用いた細胞分離方法を開発した[18]。シリコンチューブの内部に、グラフト重合によりアクリル酸をグラフトし、EDC を用いて anti-CD34 抗体を固定化した。チューブ内部にヒト間葉系肝細胞を注入し、12.5 μL ずつ回収すると、細胞表面の抗原量依存的な溶出挙動を示し、親和性の違いを利用した細胞分離を実現した。

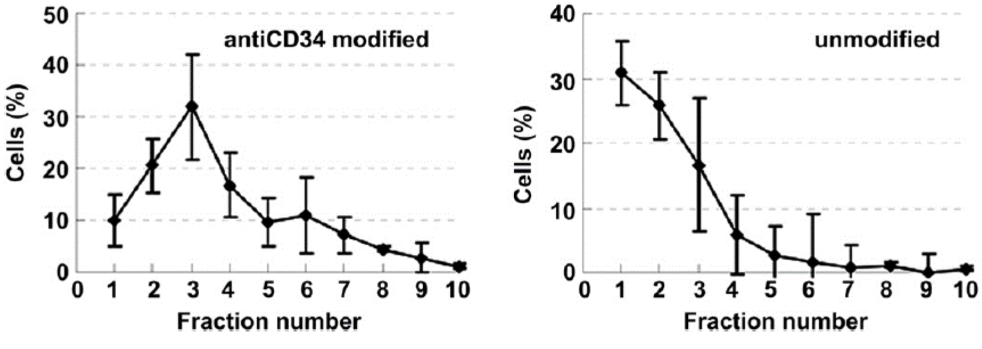

Figure 4.6. (左) 抗体固定化および (右) 抗体未固定化シリコンチューブを用いた細胞分離[18]

4.2. HVJ-E を利用した新規細胞分離方法の開発

細胞を大きさ、蛍光ラベル化、抗体などによって選別する手法は、それぞれある特異的な細胞を標的として選別するのには非常に優れている。しかし、ラベル化による細胞へのダメージや、選別できる細胞の大きさの制限を考慮すれば、利用できる細胞種は限られる。癌診断における血液中の CTCs の回収や、再生医療に関わる多くの細胞を、一種類ずつ効率よく選別可能な技術を開発することは、今後の癌診断・再生医療における重要なテーマの 1 つである。そこで本章では、細胞選別の新たな選別方法として、HVJ-E を高分子積層膜上に固定化した、細胞分離方法を考案した [19] (Figure 4.7) 。

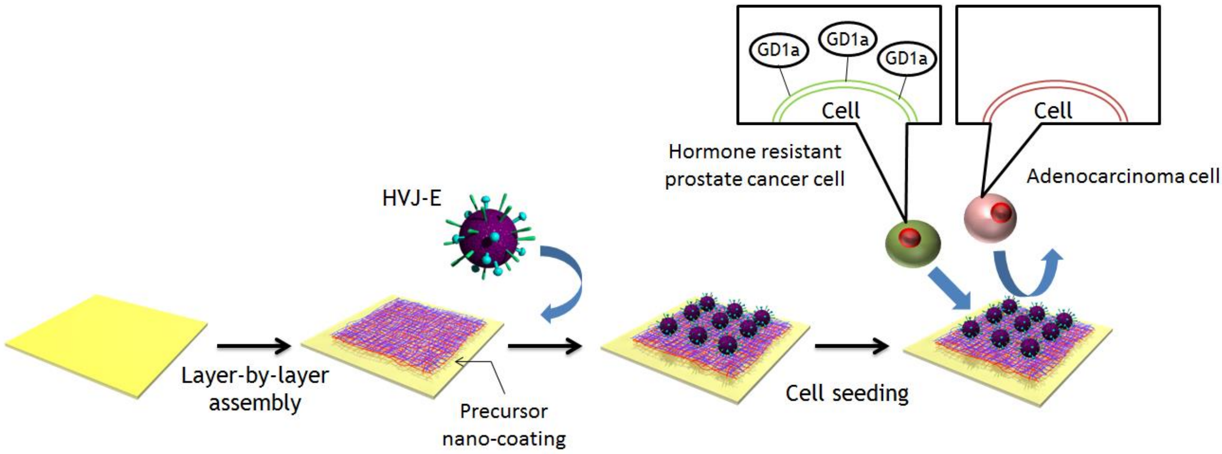

Figure 4.7. HVJ-E の表面固定化と細胞分離 [19], 基板上に LbL 膜を作製し、その表面に HVJ-E を固定化する。GD1a を発現した細胞と未発現細胞を表面に播種した場合、発現細胞のみが捕捉される

HVJ-E は、細胞表面のシアル酸の一種である GD1a を認識し、細胞に選択的に吸着する [20]。GD1a は、ヒト骨髄由来間葉系肝細胞 (hBMSC) から分化した骨細胞や、ホルモン耐性前立腺癌細胞など、特定の細胞上に多く発現していることが知られている [21–23]。つまり、それらの細胞であれば HVJ-E 自身が選択的に吸着できるということである。この HVJ-E を基材表面上に固定化させることが出来れば、固定化された HVJ-E が選択的に目的細胞のみを捕らえることができる。加えて HVJ-E の表面タンパク質は遺伝子操作により簡便に操作可能であると考えられ、捕捉する目的細胞に応じた遺伝子改変も可能である。つまり、HVJ-E の固定化技術と細胞分離の基礎技術を確立すれば、多種多様な細胞の単離・分離あるいは癌の診断などが可能となる。

しかしながら、HVJ-E のガラス基板上への固定化や、固定化により懸念される GD1a レセプターの認識能の変化、HVJ-E を利用した細胞分離技術の知見はこれまでに得られていない。そこで本項では、高分子電解質膜状に HVJ-E を固定化する技術を開発し、そのレセプター認識能や膜タンパク質の活性を評価するとともに、HVJ-E のレセプター特異的な吸着能を利用した細胞分離について報告する。

4.3. 実験

4.3.1. 本実験の概要

PLL と ALG を利用し、ガラス基板上に LbL 膜を作製した。作製した LbL 膜上に HVJ-E を吸着させ、その吸着挙動を、QCM を用いて観察した。HVJ-E が吸着した基板の表面特性を、濡れ性試験、AFM での観察により評価した。固定化された HVJ-E の膜タンパク質活性を赤血球溶血試験と細胞融合試験により評価した。HVJ-E の GD1a レセプター依存的な細胞分離能をヒト前立腺癌細胞 PC-3 と LN-Cap 細胞を用いた細胞実験により評価した。

4.3.2. ガラス基板上への Layer-by-Layer 修飾

PLL と ALG をそれぞれ Dulbecco's リン酸緩衝液 (PBS) に溶解し、それぞれ 1.0 mg/mL と 5.0 mg/mL の濃度に調整した。高分子溶液の pH を 0.1 M の塩酸および 0.1 M の水酸化ナトリウム溶液で 7.4 に調整した。はじめに、QCM の基板およびガラス基板を piranha 溶液、または界面活性剤により洗浄し、milli Q 水で 3 度洗浄し、窒素ガスにより乾燥させた。得られた基板を PLL 溶液に 15 分間浸漬し、PLL を吸着させた。吸着後、基板を milli Q 水により洗浄し、窒素ガスにより乾燥させた。続いて、得られた PLL 吸着基板を ALG 溶液に浸漬させ、15 分間吸着させた。その後基板を milli Q 水により洗浄、窒素ガスによる感想を行った。この一連のプロセスを繰り返すことで、PLL と ALG による高分子積層膜を作製した。高分子の積層挙動は水晶振動子マイクロバランス法 (QCM 法) により評価した。

4.3.3. HVJ-E の LbL 膜への固定化

凍結 HVJ-E (GE-016, 石原産業株式会社) をデシケーター内で溶解させ、所定量の PBS 溶液に分散させた。HVJ-E 濃度をそれぞれ 120, 1200, 3000, 6000 hemagglutination unit / mL (HAU/mL) に調整した。高分子を積層させた QCM、ガラス基板およびガラスチューブ内部を HVJ-E 溶液に浸漬させ、0 ~ 120 分間 HVJ-E をさせた。その後、基板を milli Q 水で洗浄し、窒素ガスにより乾燥させた。HVJ-E の吸着は QCM 法、蛍光顕微鏡および AFM により評価した。

4.3.4. Quartz Crystal Microbalance 法による評価

LbL の積層挙動と HVJ-E の吸着は QCM 法を用いた測定システムにより評価した。QCM の基板の表面積は、0.195 cm^2 のものを用いた。Sauerbrey 式を用いて振動数を質量に換算し、吸着した LbL、HVJ-E 量を検討した [24]。

4.3.5. 赤血球溶血試験

3 mL のニワトリ血液を 12 mL のリン酸緩衝液に溶かし、遠心分離 (1000 rpm, 5min)した。沈殿し

た 1 mL の赤血球を 49 mL の PBS に溶解し、赤血球溶液とした。ガラス基板、LbL 修飾ガラス基板、HVJ-E コートガラス基板、更に dithiothreitol (DTT) で処理した HVJ-E コートガラス基板を 24 well プレートに静置し、その上に 1 mL の赤血球溶液を播種した。この 24 well プレートを 37 ºC のインキュベーターに 2 時間静置した。2 時間後、それぞれの溶液をエッペンチューブに取り出し、遠心分離したのち、上澄み溶液の吸光度 (541 nm) を紫外可視分光光度計 (V-650, JASCO) により評価した。

4.3.6. 基板固定化 HVJ-E と細胞の融合試験

6000 HAU/mL の HVJ-E を pKH-26 によりラベル化し、13 層積層させた LbL 膜上に固定化した。その後、20,000 cells/mL に調整した PC-3 細胞を HVJ-E 基板上に播種し、24 時間 37ºC で培養した。PBS で細胞を洗浄したのち、4% パラホルムアルデヒド溶液で細胞を固定化し、共焦点顕微鏡 (TCS SP5, Leica) で観察した。

4.3.7. HVJ-E 固定化基板上での細胞分離

直径 15 mm の円形ガラス板表面に、上記 LbL 修飾を 13 層施した。最外層がカチオンである LbL 膜に対し、120 ~ 6000 HAU/mL の HVJ-E 溶液を浸漬し、HVJ-E を固定化した。未修飾ガラス基板、LbL 修飾ガラス基板、HVJ-E 修飾ガラス基板を、それぞれ 24 well plate に静置した。

ヒト前立腺癌細胞 PC-3 と LN-Cap (理研 Cell Bank) をそれぞれ pKH-67 と pKH-26 でラベル化したのち、10,000 cells/mL の細胞混合溶液（PC-3 : LN-Cap = 1:1）を 作製した。この細胞混合溶液を 1 mL ずつ各 well 内に播種し、所定時間培養した。培養後、各 well を PBS 溶液で２度洗浄し、残存吸着細胞数を蛍光顕微鏡で観察した。基板の細胞分離能は下記式にて算出した。

$$\text{細胞分離率}\ (\%) = \frac{\mathrm{PC}-3\ \text{細胞数}}{\text{吸着全細胞数}} \times 100$$

4.3.8. ガラスチューブを用いた細胞分離試験

ガラスチューブ内部への LbL 修飾も基板時と同様に、1.0 mg/mL の PLL 溶液、および 5.0 mg/mL の ALG 溶液を用いて行った。直径 1 mm、長さ 5.5 cm のガラスチューブ内部にペリスタポンプを用いて PLL と ALG の LbL 膜を 13 層積層した。なお、高分子の吸着時間を 15 分、milli Q 水による洗浄と、窒素ガスによる乾燥工程は同様に行った。LbL 膜の積層後、チューブ内部に HVJ-E 溶液 (6000 HAU/mL) を注入し、HVJ-E を内部に固定化させた。

HVJ-E 固定化チューブ内部にラベル化した 10,000 cells/mL の細胞混合溶液（PC-3 : LN-Cap = 1:1）50 µL を注入した。チューブを取り出し、溶液が漏れないよう栓をし、37 ºC のインキュベーターで 4 時間インキュベートした。4 時間後、9.5 mL/h の流速で細胞培養液を流し、溶出した溶液を 96 well plate に 50 µL ずつ回収した。回収後、各 well 内部の細胞数をカウントし、チューブ内に残存する細胞数を逆算した。

4.4. 結果と考察

4.4.1. Layer-by-Layer 膜の作製

HVJ-E 吸着に向けた下地膜は、いずれも生体適合性、生分解性高分子である PLL と ALG の静電相互作用を利用した LbL 法を用いて作製した。LbL 膜の積層挙動を QCM 法によって評価し、結果を Figure 4.8 に示した。

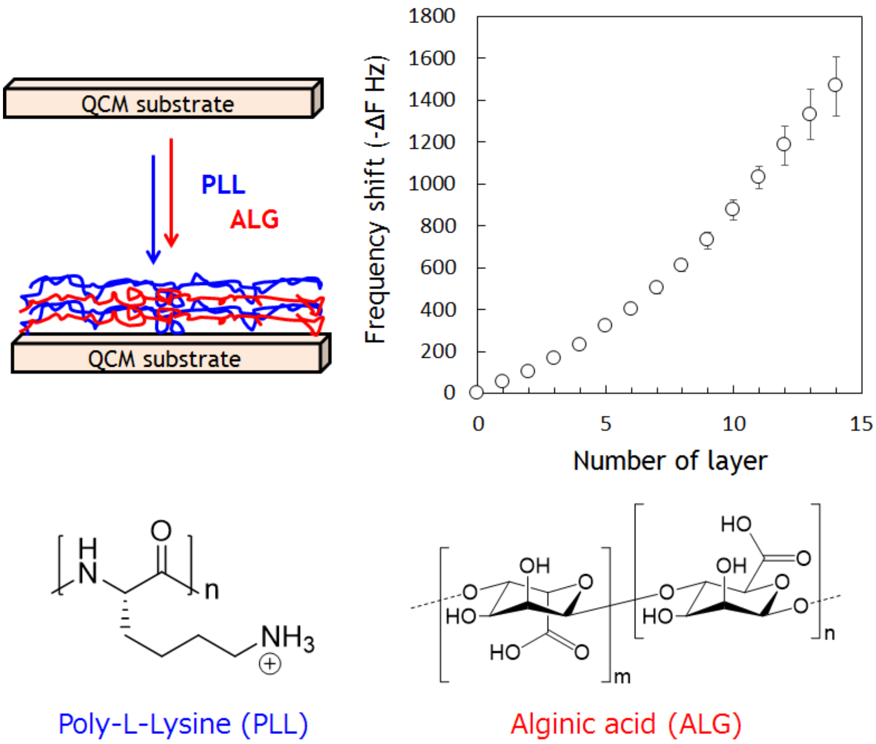

Figure 4.8. Poly-L-Lysine (PLL) と Alginic acid (ALG) を用いて作製した Layer-by-Layer 膜と QCM による評価 [19]

高分子の積層回数に伴う振動数の増加は、QCM 基板表面への高分子電解質の積層化を示している。本測定結果から、PLL と ALG の高分子電解質溶液間での LbL 膜の積層化が示された。

4.4.2. HVJ-E の LbL 膜表面への集積化

次に、HVJ-E 粒子の LbL 膜上への集積化を試みた。HVJ-E は第 2 章で検討した通り、生理条件下である pH 7.4 付近において、-20 mV 程度の負電荷に帯電しており [25]、カチオン性表面に対して強い親和性を有する。ゆえに、カチオン性高分子である PLL 最外層の表面においてのみ、HVJ-E の集積がみられると考えられた。

そこで、LbL 膜の積層回数に対する HVJ-E の集積量変化を調べるため、異なる LbL 積層回数における HVJ-E の吸着量を調査した (Figure 4.9 a)。

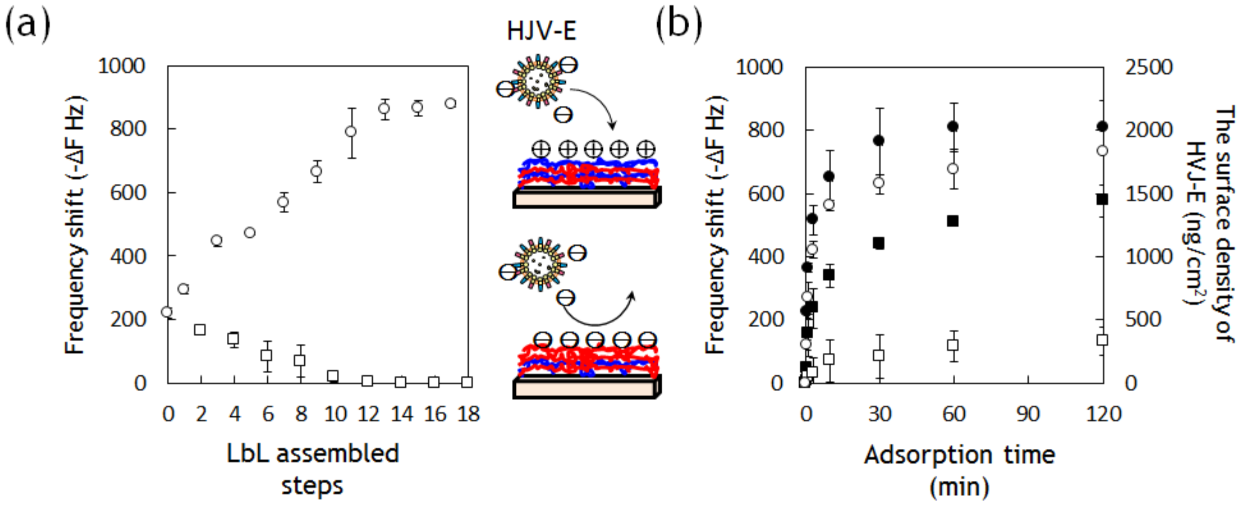

Figure 4.9. (a) (○) PLL 最外層, (□) ALG 最外層における LbL の積層回数に対する HVJ-E の吸着量変化 (b) LbL 11 層積層時における HVJ-E 溶液濃度と吸着時間が与える HVJ-E 集積量への影響。HVJ-E 溶液はそれぞれ (●) 6000 HAU/mL, (○) 3000 HAU/mL, (■) 1200 HAU/mL, (□) 120 HAU/mL[19]

HVJ-E の表面への吸着量は、PLL 最外層時においては積層回数に応じて徐々に増加し、13 層以降で一定値を迎える (Figure 4.9 a) 。一方で、アニオン性最外層である ALG が最外層の場合には、HVJ-E の吸着量は、下地膜の積層回数の増加と共に減少し、12 層を超えると HVJ-E は表面に吸着しないという結果が得られた。ALG が最外層の場合、ALG が有する負電荷と、HVJ-E が有する負電荷が静電的に反発し、その吸着量が減少していくと考えられる。積層数の増加と共にカチオン最表面の場合は HVJ-E の吸着量の増加、アニオン最表面の場合は吸着量の減少という結果は、LbL 積層回数 0-11 層の段階では積層膜が基板表面全てを覆いきっておらず、高分子層を 12 層以上積層した場合に、基板全体が高分子により覆われていることを示している。

次に、HVJ-E の濃度と吸着時間依存的な表面への吸着量を検討した (Figure 4.9)。HVJ-E の表面への吸着量は、HVJ-E 溶液の濃度と吸着時間依存的に増加し、HVJ-E 濃度が 6000 HAU/mL、吸着時間を 60 分以上とした場合に表面への HVJ-E 集積量が極大値を迎える。HVJ-E の溶液濃度と表面への吸着量の関係を Langmuir の吸着等温式 [26] に当てはめると、等温式上にほぼ直線的に増加することが明らかとなった（Figure 4.10）。この結果は HVJ-E が単層で、尚且つ、ほぼ最密的に表面に吸着していることを示唆している。

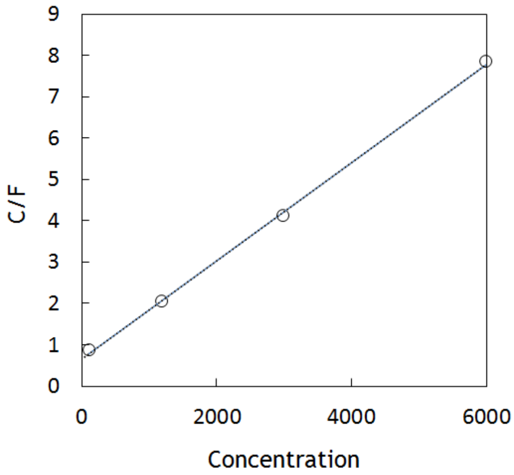

Figure 4.10. HVJ-E の LbL 表面への吸着時における濃度と吸着量の関係 [19]

通常、生理活性物質を表面に単層で吸着させるのは非常に難しい。なぜなら、吸着させた物質同士がお互いに凝集してしまうからである。これまでの研究成果によれば、HVJ-E は pH や塩濃度の変化によって凝集することが分かっており、その凝集を防ぎつつ表面に吸着させるのは非常に難しいことが予想された [25]。しかしながら、今回の結果はそれを防ぎつつ、単層的に吸着させることに成功したことを示唆している。

4.4.3. 基板の蛍光顕微鏡による観察

HVJ-E の吸着を確認するために、赤色蛍光色素である pKH-26 によってラベル化した HVJ-E を PLL 表面に吸着させた (Figure 4.11) 。HVJ-E の吸着以前、表面には赤い蛍光色素は観られなかったが (Figure 4.11 a) 、HVJ-E 吸着後には強い赤色の蛍光色素が観察された (Figure 4.11 b)。この結果は、HVJ-E の表面への吸着を支持する結果である。

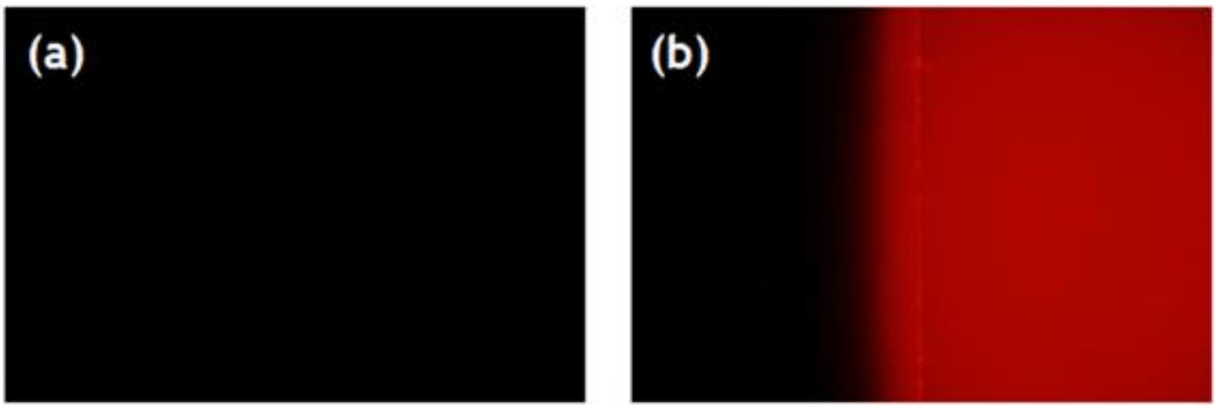

Figure 4.11. pKH-26 ラベル化した HVJ-E の (a)吸着前 (b) 吸着後の LbL 修飾基板

4.4.4. 原子間力顕微鏡による表面観察

表面へ吸着した HVJ-E を原子間力顕微鏡 (AFM) によって評価した。濃度の異なる HVJ-E 溶液 (120、1200、6000 HAU/mL) を用いて、HVJ-E を PLL 最表面に吸着させた。HVJ-E を吸着させていない LbL 表面では、表面の大きな粗さは見られない。しかし、HVJ-E 溶液の濃度を増加させると、表面上に球形の構造体の増加が観察された。HVJ-E の溶液濃度依存的に、球形の構造体が増加していた (Figure 4.12 d)。QCM や蛍光顕微鏡の結果を考慮して考えれば、HVJ-E が AFM で観察された粒子であることが推察される。これらの結果は、HVJ-E の表面への吸着を強く支持する結果である。

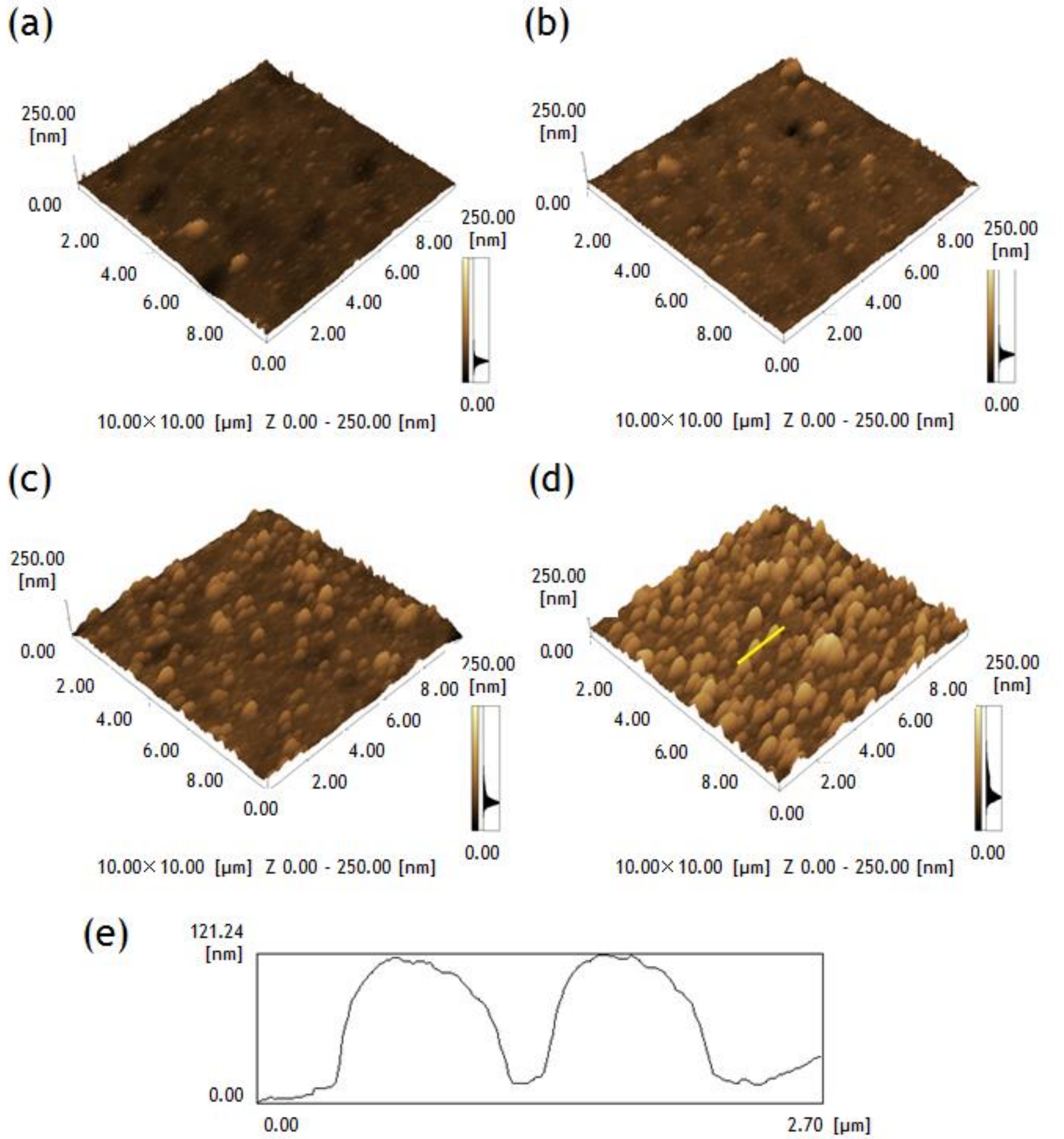

Figure 4.12. 原子間力顕微鏡 (AFM) による (a) 0, (b) 120, (c) 1200, (d) 6000 HAU/mL の HVJ-E 溶液を用いて作製した HVJ-E 吸着基板の観察と、(e) (d)の黄線部位における断面図 [19]

4.4.5. HVJ-E 固定化基板表面の濡れ性評価

作製した LbL 膜、および HVJ-E 吸着表面の濡れ性を接触角測定装置により評価した（Figure 4.13）。LbL 膜を修飾したガラス基板は表面接触角を約 50º 付近に有し、やや親水的な表面であることが示された。HVJ-E を修飾した表面では接触角は更に減少し、約 30º 程度にまで下がることが、本実験結果より明らかとなった。

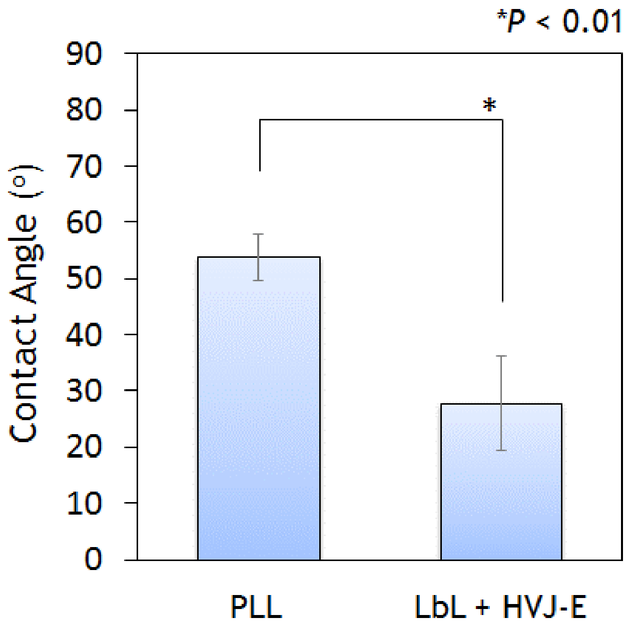

Figure 4.13. PLL 最外層の LbL 膜（PLL）と HVJ-E 吸着表面（LbL+HVJ-E）の接触角測定 [19]

HVJ-E の吸着により表面の接触角が変化したのは、HVJ-E の膜タンパク質の性質に由来すると考えられる。HVJ-E のエンベロープ上には膜タンパク質 HN と F がその主要構成成分として存在する (Figure 4.14）。HN と F いずれのタンパク質も、そのドメイン構造はエンベロープ外部、内部、中間部に分けられ、エンベロープ外部と内部は親水的ドメイン、エンベロープ内部は疎水的ドメインであることが、これまでの研究結果で報告されている [27]。すなわち、エンベロープ外部に存在する HVJ-E タンパク質の親水的ドメインが、LbL 膜上に多量に集積されたことで、HVJ-E の吸着した表面は高い親水性を示したと考えられる。

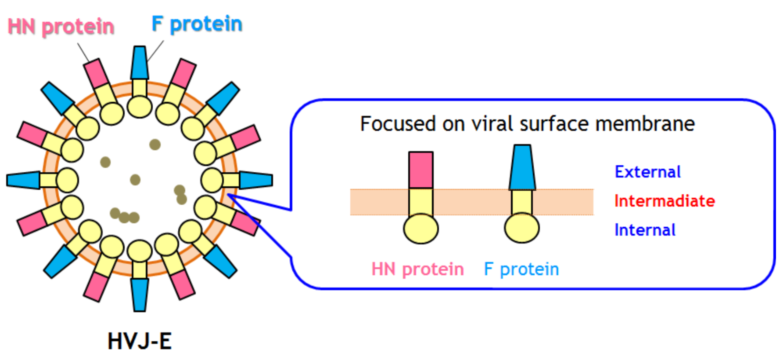

Figure 4.14. HVJ-E の膜タンパク質の構造

4.4.6. 固定化 HVJ-E の表面タンパク質の活性評価

表面に固定化した HVJ-E のタンパク質活性を、赤血球を用いた hemolysis assay により評価した。通常、センダイウイルスなどのウイルスは、赤血球に対して hemolysis を起こすことが知られている[28]。HVJ-E も同様に、不活化後も表面タンパク質が活性を維持しており、赤血球に対して hemolysis を引き起こす[25]。HVJ-E の膜タンパク質が赤血球と融合し、その際に赤血球内のヘモグロビンを液中に溶出させる。つまり、溶液中に溶出したヘモグロビン量を定量することで、ウイルスのタンパク質活性を評価することができる。この反応を通常 hemolysis と呼び、インフルエンザウイルスの定量や高分子ミセルの膜透過性試験などにも用いられている[29]。

Hemolysis assay 後の各溶液を遠心分離後、上澄みの吸光度 (541 nm) の測定から hemolysis 活性を評価し、Figure 4.15 (a) にまとめた。

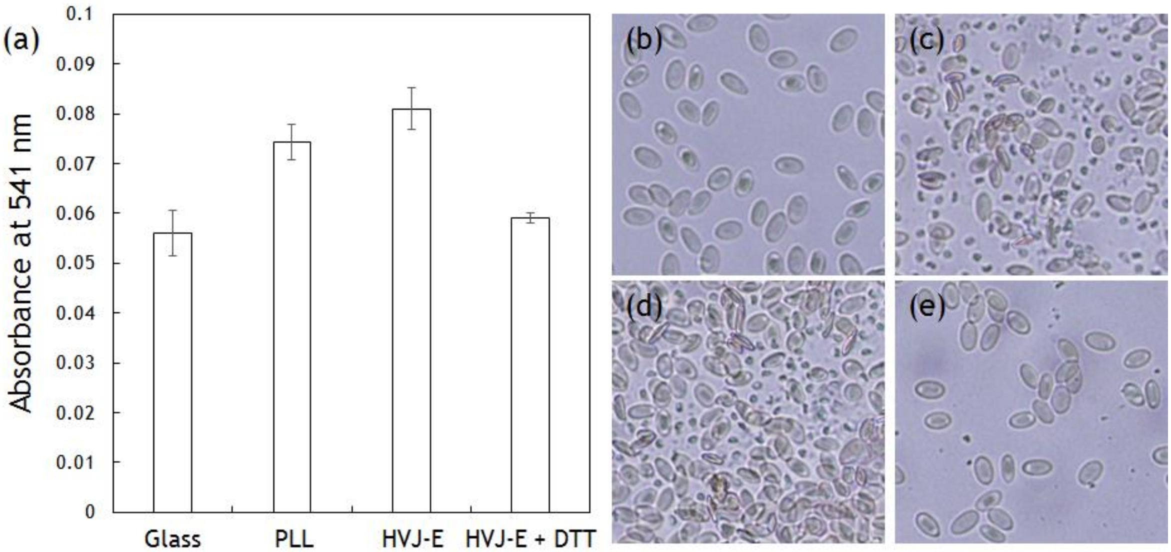

Figure 4.15. (a) non-coated glass (Glass), PLL 最外層の LbL 膜 (PLL), HVJ-E 吸着基板 (HVJ-E) および HVJ-E 吸着基板 + dithiothreitol (HVJ-E+DTT) 各基板との Hemolysis assay 反応後の上澄み吸光度 (b) non-coated glass, (c) PLL, (d) HVJ-E, (e) HVJ-E + DTT それぞれの基板上に播種された赤血球の顕微鏡観察[19]

Hemolysis 活性はガラス基板上ではほとんど見られなかった (Figure 4.15 a) 。顕微鏡の観察では、ガラス基板上における赤血球は楕円形を維持していた (Figure 4.15 b)。この結果から、得られた吸光度の検出は遠心分離によって引き起こされた赤血球の破壊によるもので hemolysis ではないと考えられる。一方、PLL 最外層の LbL 膜の場合、吸光度の上昇が観察され、赤血球からのヘモグロビン溶出が確認された。顕微鏡における観察では多くの赤血球が破壊され、且つ表面へと吸着していた (Figure 4.15 c)。PLL は非常に強いカチオン性を有し、直鎖状の高分子であることから、カチオン性高分子とアニオン電荷をもつ赤血球が互いに静電相互作用により引き合い赤血球を吸着させる。PLL は赤血球の細胞膜にアンカリングすることで、赤血球に溶血を引き起こし、ヘモグロビンが溶出すると考えらえる。

一方、HVJ-E 吸着基板では、541 nm の吸光度はさらに上昇した (Figure 4.15 a)。興味深いことに、HVJ-E 吸着基板表面には、赤血球が多量に吸着していた (Figure 4.15 d) 。赤血球は表面にアニオン電荷を有しているのにもかかわらず、アニオン電荷を有する HVJ-E 表面においても多量に吸着し

ていた。この結果は、HN タンパク質が、赤血球表面の GD1a を認識し、捕捉していることを示唆している。これらの実験結果から、HVJ-E が表面に吸着後も HN タンパク質および F タンパク質の活性を保持していることが示された。

HVJ-E のタンパク質の活性を検証するために、固定化された HVJ-E のウイルス膜タンパク質を dithiothreitol (DTT) で阻害した [30]。DTT により不活化した基板を用いて hemolysis assay を行ったところ、赤血球の表面への吸着は確認されたが、溶血活性はガラス基板とほぼ同等であった (Figure 4.15 a, e)。これらの実験結果は、HVJ-E が LbL 膜への吸着後も膜タンパク質の活性を維持していることを強く示す結果である。

4.4.7. 基板固定化 HVJ-E の細胞への膜融合能の検討

通常、溶液中に分散した HVJ-E は HVJ-E 上の HN タンパク質が細胞表面のシアル酸を認識してその表面へと吸着、さらに F タンパク質が細胞の脂質二分子膜にアンカリングすることで細胞の細胞膜に融合する [31]。この現象を膜融合という。通常、インフルエンザウイルスなどのウイルスは一度細胞表面に吸着した後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。エンドソームの pH 低下に伴い膜タンパク質の構造が変化し、膜融合タンパク質の疎水性部分が露出し、エンドソーム膜と融合する [32]。しかし HVJ-E の場合では、細胞の細胞膜表面において、レセプター吸着後すみやかに細胞膜と融合することが可能であり、これがセンダイウイルスの持つ膜融合と呼ばれる性質である。

この HVJ-E の膜融合能を、固定化後も保持しているかどうかを調べるために、固定化 HVJ-E 上に細胞を播種し、検討することにした。HVJ-E を pKH-26 で赤色ラベル化し、LbL 膜上に吸着させた。ヒト前立腺癌細胞の 1 種である PC-3 細胞を播種し、24 時間培養した。24 時間後、細胞を固定化し共焦点顕微鏡を用いて評価した (Figure 4.16) 。

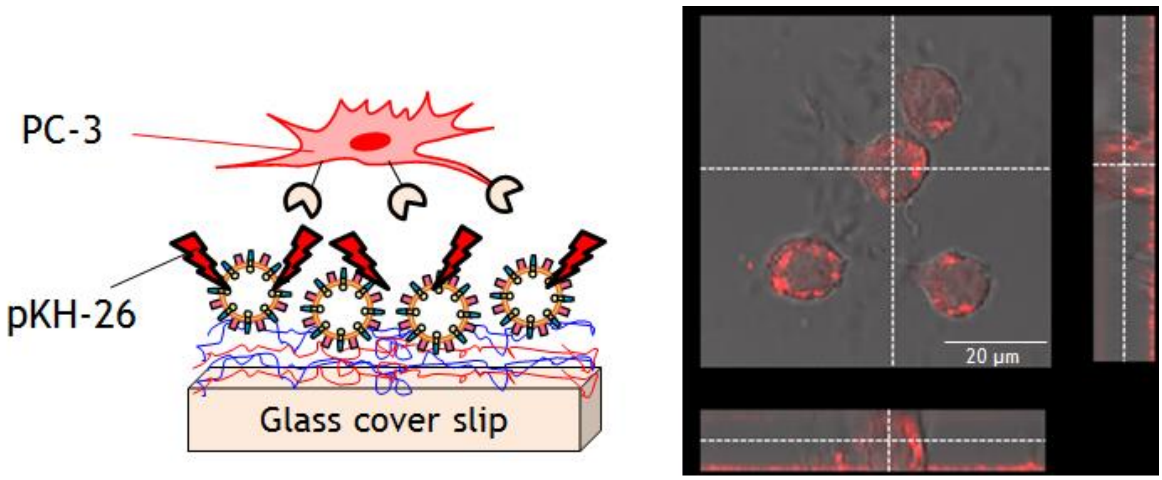

Figure 4.16. 共焦点顕微鏡による、pKH-26 ラベル化 HVJ-E 固定化基板上に播種された PC-3 細胞の観察

共焦点顕微鏡の観察では、固定化した基板上に赤色蛍光ラベル化された HVJ-E が集積されていることが確認された。加えて、Z スキャンにより、PC-3 細胞の細胞膜が赤色蛍光によって染色された。通常、HVJ-E はエンドサイトーシスで取り込まれるのではなく、細胞膜との膜融合によって取

り込まれることを考慮すれば、この結果は HVJ-E が固定化後も膜融合能を発現し、細胞膜と融合していることを示している。赤血球での hemolysis 試験と、本染色実験の結果は、HVJ-E がウイルスタンパク質の活性を損なうことなく、基材表面に固定化されていることを強く示している。

4.4.8. HVJ-E 固定化基板上での細胞培養

作製した HVJ-E 固定化基板を細胞分離へ応用するため、HVJ-E 固定化基板の細胞毒性を検討した。フィブロネクチンコートしたガラス基板 (FN)、PLL を最外層に有する LbL 膜 (PLL) および HVJ-E を固定化した基板 (HVJ) 上でヒト前立腺癌細胞 PC-3 と LN-Cap をそれぞれ 24 ~ 72 時間培養した。培養後、細胞の生存を Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。PC-3 と LN-Cap はいずれの基板上でも 72 時間増殖を続けた。細胞の接着率の違いから、それぞれの基板間での初期接着量が違うが、いずれの細胞においても 72 時間増殖したこと考慮すると、本基板の細胞毒性は低く、細胞培養へ応用可能であることが示唆された。

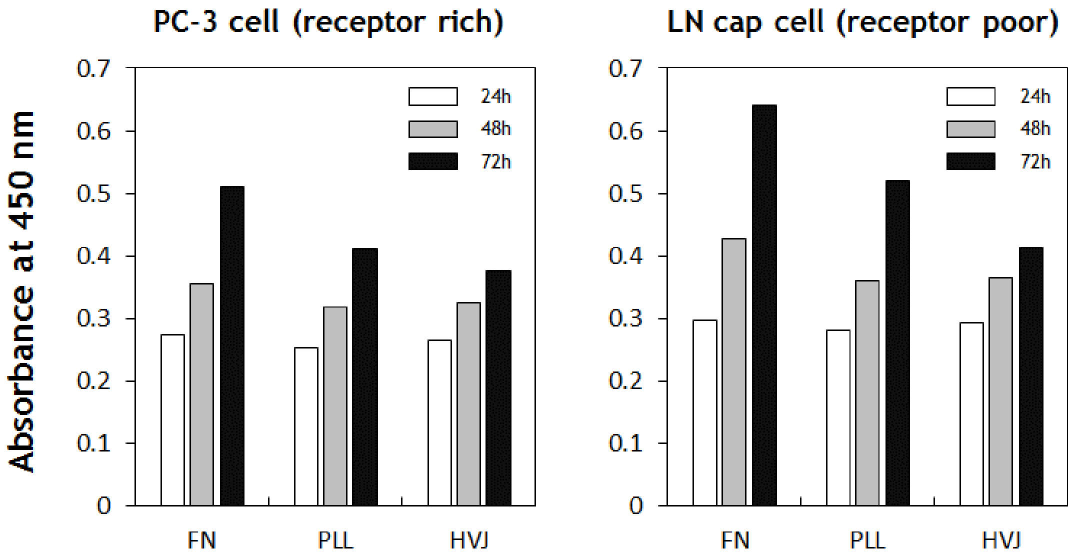

Figure 4.17. フィブロネクチンコートガラス (FN) 、PLL 最外層の LbL 膜 (PLL) および HVJ-E 固定化基板 (HVJ-E) 上での PC-3 と LN-Cap 細胞の増殖評価

一方、基板上での細胞の形態は PC-3 と LN-Cap で異なり、結果を Figure 4.18 にまとめた。PC-3 と LN-Cap 細胞は FN-glass および PLL 上ではほぼ差は観られず、細胞は基板に接着していた (Figure 4.18 a)。HVJ-E 基板上では、PC-3 細胞は FN-glass, PLL とほぼ同等に接着していた。一方 LN-Cap 細胞は表面に接着せず、細胞間で凝集し凝集塊を形成した。本基板を PBS で二度洗浄すると、HVJ-E 基板上の LN-Cap 細胞のみがほぼ完全に脱離した (Figure 4.18 b, c)。

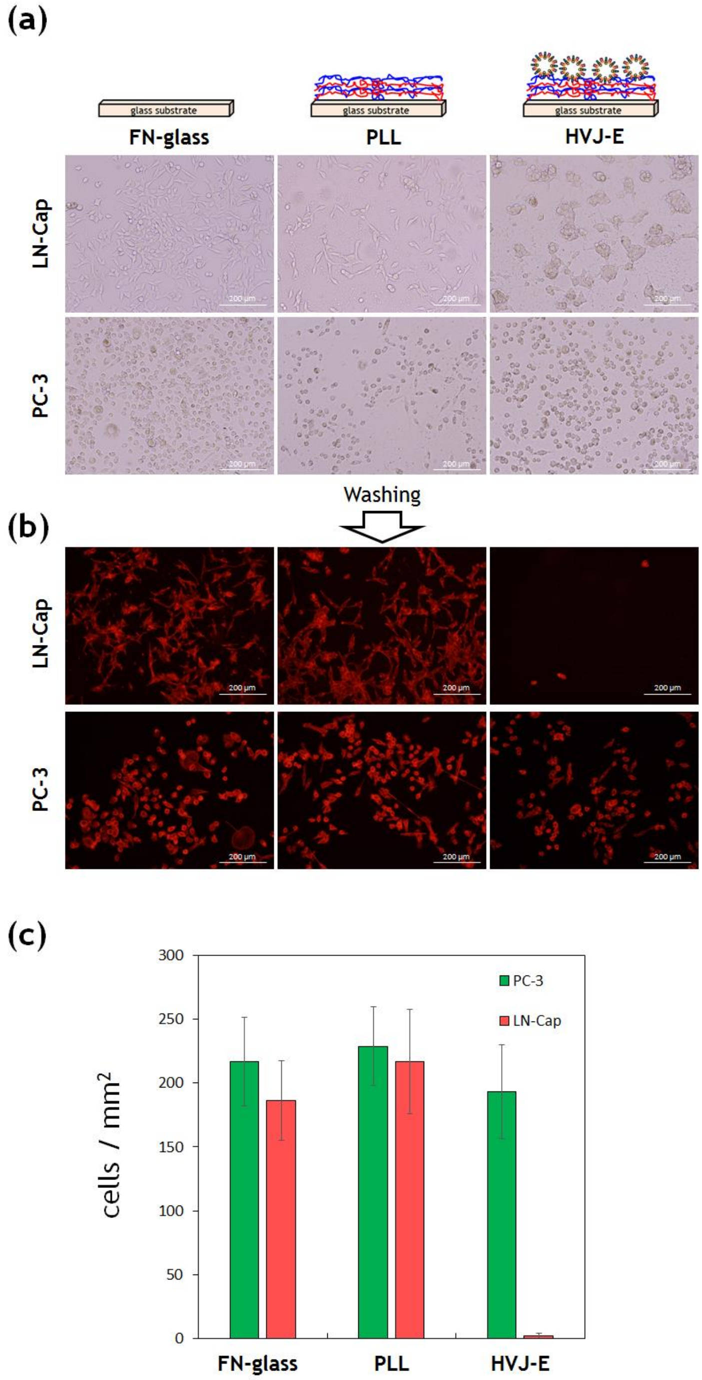

Figure 4.18. (a) FN-glass, PLL および HVJ-E 固定化基板上で 72 時間培養した PC-3 と LN-Cap 細胞と (b) PBS で洗浄後の細胞、および (c) 洗浄後の各基板上での吸着細胞数

QCM の結果から基板の表面には HVJ-E がほぼ最密充填様に固定化されていると考えられる。固定化された HVJ-E 基板は接触角が約 30º と親水性が高い基板となっている。LN-Cap 細胞は、PC-3 細胞と比較し、細胞表面に GD1a をほとんど有さない[20]ため、HVJ-E の集積された基板上では、LN-Cap 細胞は表面とのアフィニティが得られない。そのため、表面に吸着できず凝集塊を生じたと考えられる。この実験結果から、本基板は GD1a の有無を認識し、吸着を制御可能な基板であること

が示唆された。

4.4.9. 細胞混合液での細胞分離試験

PC-3 と LN-Cap の細胞混合液を用いて HVJ-E 固定化基板の細胞分離能を検討した。PC-3 と LN-Cap を、それぞれ緑色蛍光色素の pKH-67 および赤色蛍光色素の pKH-26 でラベル化し、基板上へと播種した。24 時間後、基板を PBS で洗浄したのち、蛍光顕微鏡で接着細胞を観察した (Figure 4.19 a)。PC-3 と LN-Cap は FN および PLL 基板上では、ほぼ 1 ： 1 で吸着していた。一方、HVJ-E 基板上では、吸着していた細胞がほぼ PC-3 細胞であった。Figure 4.18 の結果と同様に、LN-Cap 細胞は HVJ-E 基板上で表面へと吸着できないと考えられる。

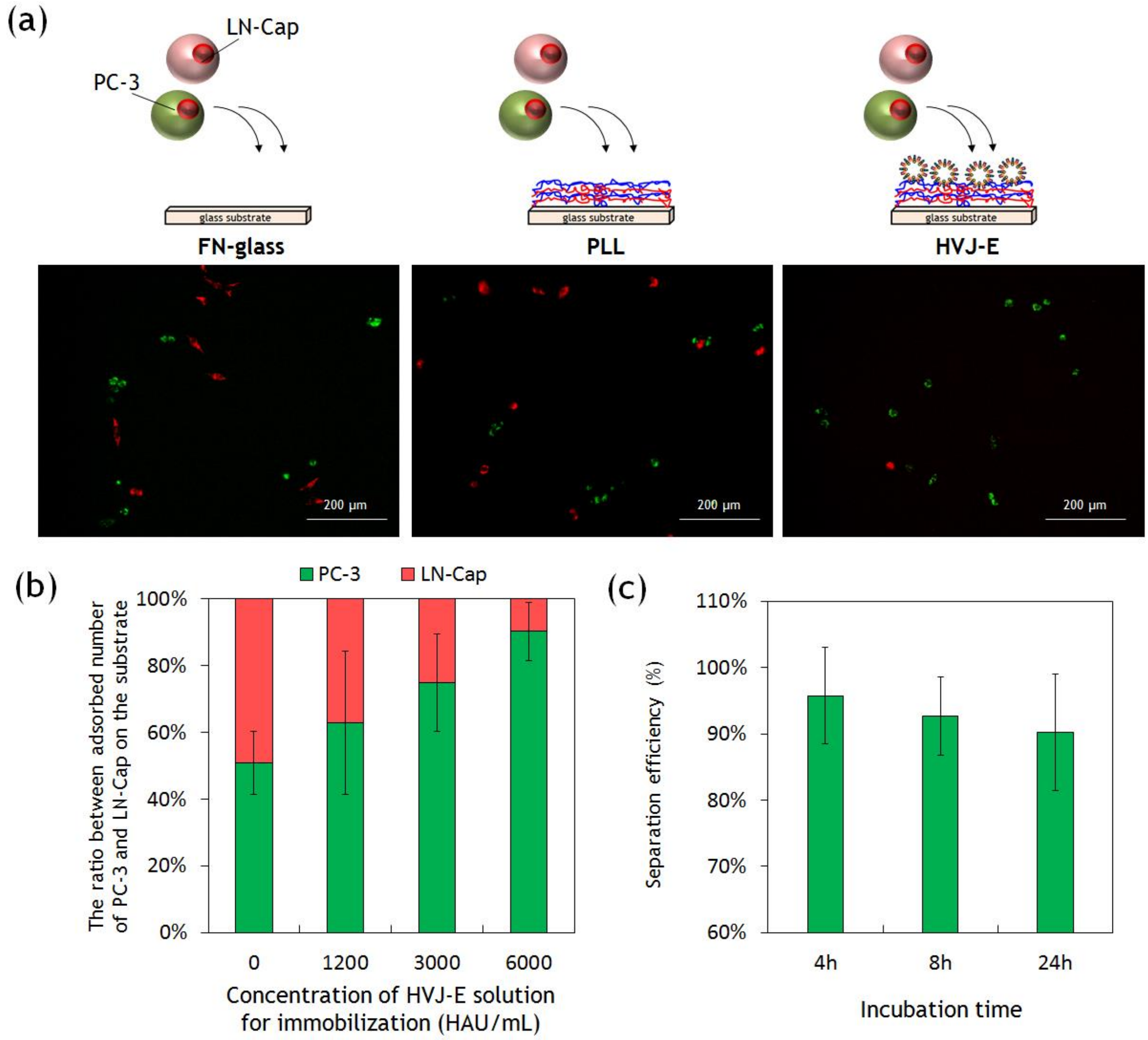

Figure 4.19. (a) PC-3 (緑) と LN-Cap (赤) を FN, PLL および HVJ-E 基板上に播種し、24 時間培養後に PBS で洗浄後の蛍光顕微鏡の観察図 (b) 異なる HVJ-E 固定化量の基板上での細胞分離能試験 (c) 6000 HAU/mL の基板上での時間依存的な細胞分離能

HVJ-E 由来の細胞分離が実現できているかを検討するため、HVJ-E の固定化量を変化させた場合の細胞分離能を検討した (Figure 4.19 b) 。HVJ-E 未吸着基板上 (コントロール) では細胞分離率は約 50 %であった。つまり、細胞分離能は有さない。細胞分離能は固定化させた HVJ-E 量依存的に増加し、6000 HAU/mL の HVJ-E 固定化条件では約 90 %まで増加した。この結果は、HVJ-E が細胞分離能に影響することを支持している。次に、細胞分離能の時間依存性を検討した (Figure 4.19 c)。播種した細胞の培養時間を 24 時間から 8 時間、4 時間と減少させると、細胞分離能は約 95%にまで上昇した。この結果から、細胞分離能の時間依存性が観察された。

HVJ-E は GD1a を認識し、細胞を捕捉する。しかし、細胞が 24 時間という長期にわたってウイルスと触れることで非特異的な吸着が起こると推定される。例えば、レトロウイルスは、レセプターを認識して細胞に吸着するウイルスであるが、時間依存的な非特異吸着性も報告されている [33]。これらの報告は、HVJ-E が LN-Cap 細胞と長時間接することにより非特異的に吸着させていることを示唆する。また、LN-Cap 細胞は細胞表面の GD1a 量はゼロではない [20]。そのため、長時間の培養により、LN-Cap 上のわずかな量の GD1a を HVJ-E が認識し、細胞を捕捉したのかもしれない。いずれにせよ、本実験結果により、HVJ-E 吸着技術を用いることによって、細胞分離を実現した。

4.4.10. ガラスチューブを用いた細胞分離

次にガラスチューブ内部への HVJ-E の吸着を検討した。チューブ・カラム方式を実現することにより、医用分野での利便性向上、および、目的細胞の 100 %収率を実現できると期待した。LbL 法はどのような基板であっても表面を修飾できるという利点がある [34–39]。ガラスチューブの内部のような曲率を有する基板であっても、高分子膜を安定的に作製可能である。

HVJ-E を内部に吸着させたガラスチューブに PC-3 と LN-Cap の混合液を導入し、4 時間培養させた (Figure 4.20 a) 。4 時間後、9.5 mL/h の流速で溶液を溶出させ、溶液を 96 well プレートに 50 µL ずつ回収し、Well 内部の細胞数をカウントした。Well 内部の細胞数から、チューブ内の細胞数を逆算し、Figure 4.20 b にまとめた。

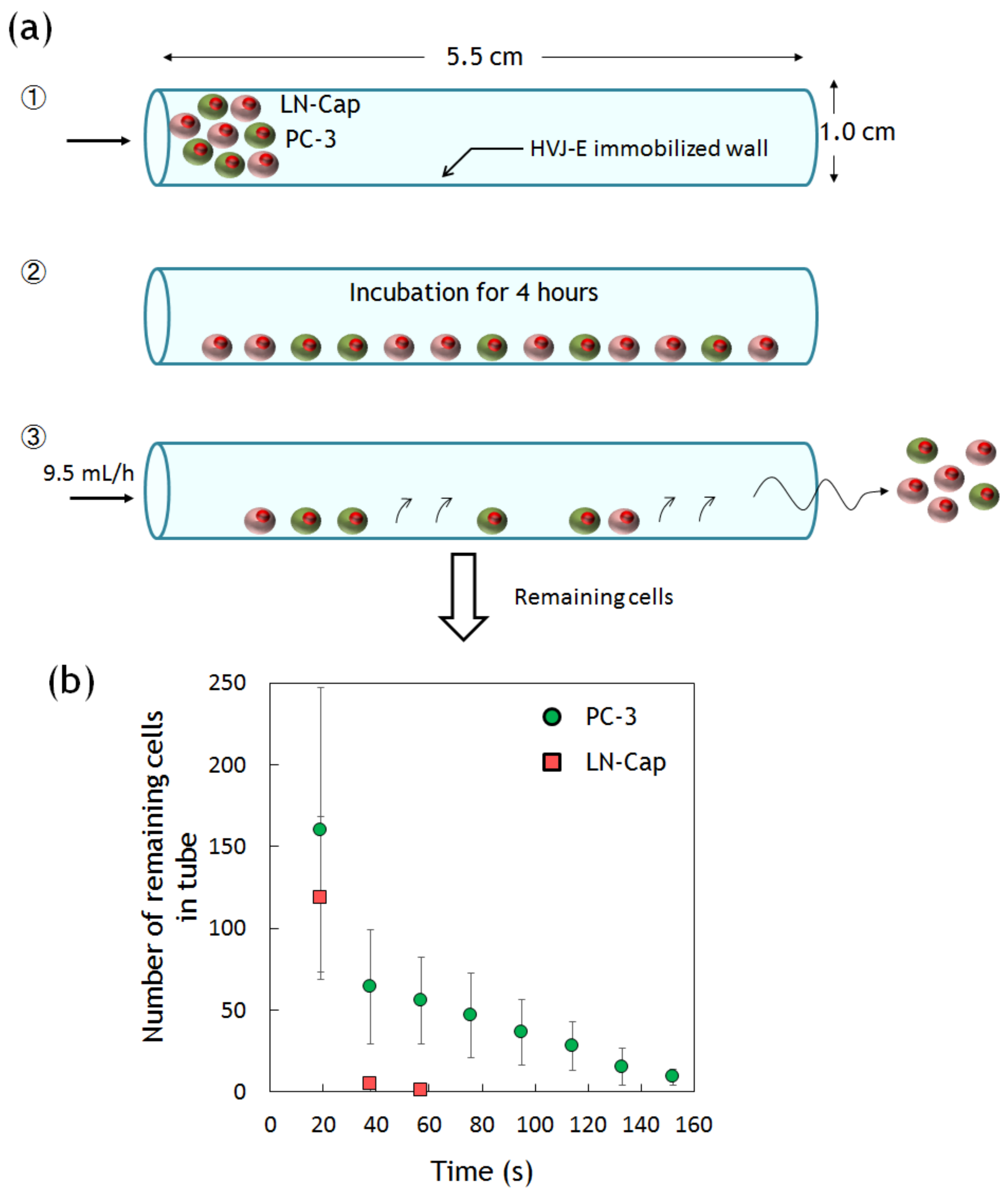

Figure 4.20. (a) ガラスチューブを用いた細胞分離概念図。① PC-3 と LN-Cap を HVJ-E を吸着させたチューブ内に導入する。② チューブを 4 時間培養する。③ 9.5 mL/h の流速で培養液を流入し、溶出した細胞を 50 μL ずつフラクションに集め、細胞数をカウントする。(b) 溶出時間の経過に伴うガラスチューブ内の残存細胞数の変化

各フラクションの PC-3 および LN-Cap の細胞数をカウントすると、LN-Cap はほぼ最初のフラクションで細胞が溶出するのに対し、PC-3 細胞はやや遅れて流出してくることが明らかとなった。

PC-3 細胞は固定化 HVJ-E に捕捉されることが Figure 4.18 および Figure 4.19 の実験から明らかである。つまり、HVJ-E により PC-3 細胞が捕捉され、溶出時間が遅れていると考えられる。本手法を用いることで、60 s 以降に溶出した溶液をすべて回収することで、PC-3 細胞のみを 100 %回収することが可能となる。

2 次元平面での細胞分離では、約 95%の細胞分離が実現可能であった。しかしながら、チューブを用いた細胞分離であれば、溶出時間をコントロールすることで、ほぼ 100 %の細胞分離を実現できた。

4.5. 結論

本章では、HVJ-E 粒子を、PLL と ALG の 2 種類の生体適合性高分子を、LbL 法を利用して積層化した高分子電解質膜上に固定化し、HVJ-E のタンパク質活性の評価と細胞分離能を検討した。LbL の積層化、および HVJ-E の基板上への集積化は QCM 法、蛍光顕微鏡、AFM により評価した。QCM の測定結果によると、HVJ-E は LbL 膜上に単層吸着していることが示唆された。固定化された HVJ-E の膜タンパク質の活性が、表面固定化後も維持されていることが溶血試験と膜融合能試験により確認された。ガラス基板上、およびガラスチューブ内に HVJ-E を固定化した基材を用いて前立腺癌細胞の PC-3 細胞と LN-Cap 細胞の細胞分離試験を行ったところ、いずれの基板においても細胞分離が実現できた。ガラスチューブでの分離においては、溶出時間を管理することにより、PC-3 細胞を 100 %分離することに成功した。本技術を用いることで、細胞選別が必要な再生医療や、癌診断への貢献が可能となるであろう。

4.6. 参考文献

(1) Yu, M.; Stott, S.; Toner, M.; Maheswaran, S.; Haber, D. A. Circulating Tumor Cells: Approaches to Isolation and Characterization. *J. Cell Biol.* **2011**, *192*, 373–382.

(2) Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872.

(3) Nagy, A.; Rossant, J.; Nagy, R.; Abramow-Newerly, W.; Roder, J. C. Derivation of Completely Cell Culture-Derived Mice from Early-Passage Embryonic Stem Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 8424–8428.

(4) Amit, M.; Carpenter, M. K.; Inokuma, M. S.; Chiu, C.-P.; Harris, C. P.; Waknitz, M. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Thomson, J. A. Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. *Dev. Biol.* **2000**, *227*, 271–278.

(5) Chambers, I.; Colby, D.; Robertson, M.; Nichols, J.; Lee, S.; Tweedie, S.; Smith, A. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell* **2003**, *113*, 643–655.

(6) Yamanaka, S. A Fresh Look at iPS Cells. *Cell* **2009**, *137*, 13–17.

(7) Herzenberg, L. A.; Sweet, R. G.; Herzenberg, L. A. Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Sci. Am.* **1976**, 108–117.

(8) Herzenberg, L. a; Bianchi, D. W.; Schröder, J.; Cann, H. M.; Iverson, G. M. Fetal Cells in the Blood of Pregnant Women: Detection and Enrichment by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 1453–1455.

(9) Fu, A. Y.; Spence, C.; Scherer, A.; Arnold, F. H.; Quake, S. R. A Microfabricated Fluorescence-Activated Cell Sorter. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 1109–1111.

(10) Malatesta, P.; Hartfuss, E.; Götz, M. Isolation of Radial Glial Cells by Fluorescent-Activated Cell Sorting Reveals a Neuronal Lineage. *Development* **2000**, *127*, 5253–5263.

(11) Durgadas, C. V.; Sharma, C. P.; Sreenivasan, K. Fluorescent and Superparamagnetic Hybrid Quantum Clusters for Magnetic Separation and Imaging of Cancer Cells from Blood. *Nanoscale* **2011**, *3*, 4780–4787.

(12) Marotta, R.; Manna, L.; Pellegrino, T.; Corato, D. I.; Al, E. T. Multifunctional Nanobeads Based on Quantum Dots and Magnetic Cell Targeting and Sorting. *ACS Nano* **2011**, *5*, 1109–1121.

(13) Hosokawa, M.; Hayata, T.; Fukuda, Y.; Arakaki, A.; Yoshino, T.; Tanaka, T.; Matsunaga, T. Size-Selective Microcavity Array for Rapid and Efficient Detection of Circulating Tumor Cells. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6629–6635.

(14) Hosokawa, M.; Yoshikawa, T.; Negishi, R.; Yoshino, T.; Koh, Y.; Kenmotsu, H.; Naito, T.; Takahashi, T.; Yamamoto, N.; Kikuhara, Y.; et al. Microcavity Array System for Size-Based Enrichment of Circulating Tumor Cells from the Blood of Patients with Small-Cell Lung Cancer. *Anal. Chem.* **2013**,

85, 5692–5698.

(15) Negishi, R.; Hosokawa, M.; Nakamura, S.; Kanbara, H. Biosensors and Bioelectronics Development of the Automated Circulating Tumor Cell Recovery System with Microcavity Array. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 438–442.

(16) Stott, S. L.; Hsu, C.-H. C.-H.; Tsukrov, D. I.; Yu, M.; Miyamoto, D. T.; Waltman, B. a.; Rothenberg, S. M.; Shah, A. M.; Smas, M. E.; Korir, G. K.; et al. Isolation of Circulating Tumor Cells Using a Microvortex-Generating Herringbone-Chip. *October* **2010**, *107*, 18392–18397.

(17) Li, W.; Reátegui, E.; Park, M.-H.; Castleberry, S.; Deng, J. Z.; Hsu, B.; Mayner, S.; Jensen, A. E.; Sequist, L. V.; Maheswaran, S.; et al. Biodegradable Nano-Films for Capture and Non-Invasive Release of Circulating Tumor Cells. *Biomaterials* **2015**, *65*, 93–102.

(18) Mahara, A.; Yamaoka, T. Continuous Separation of Cells of High Osteoblastic Differentiation Potential from Mesenchymal Stem Cells on an Antibody-Immobilized Column. *Biomaterials* **2010**, *31*, 4231–4237.

(19) Okada, T.; Uto, K.; Aoyagi, T.; Ebara, M. A Biomimetic Approach to Hormone Resistant Prostate Cancer Cell Isolation Using Inactivated Sendai Virus (HVJ-E). *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 96–103.

(20) Kawaguchi, Y.; Miyamoto, Y.; Inoue, T.; Kaneda, Y. Efficient Eradication of Hormone-Resistant Human Prostate Cancers by Inactivated Sendai Virus Particle. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2478–2487.

(21) Kirsch, S. Ceramide Profiles of Human Serum Gangliosides GM2 and GD1a Exhibit Cancer-Associated Alterations. *J. Glycomics Lipidomics* **2012**, *01*. doi:10.4172/2153-0637

(22) Bergante, S.; Torretta, E.; Creo, P.; Sessarego, N.; Papini, N.; Piccoli, M.; Fania, C.; Cirillo, F.; Conforti, E.; Ghiroldi, A.; et al. Gangliosides as a Potential New Class of Stem Cell Markers: The Case of GD1a in Human Bone Marrow Stem Cells. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 549–560.

(23) Hatano, K.; Miyamoto, Y.; Mori, M.; Nimura, K.; Nakai, Y.; Nonomura, N.; Kaneda, Y. Androgen-Regulated Transcriptional Control of Sialyltransferases in Prostate Cancer Cells. *PLoS One* **2012**, *7*, 21–24.

(24) Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen Zur Wagungdiinner Schichten Und Zur Mikrowagung. *Zeitschrift fur Phys.* **1959**, *155*, 206–222.

(25) Okada, T.; Uto, K.; Sasai, M.; Lee, C. M.; Ebara, M.; Aoyagi, T. Nano-Decoration of the Hemagglutinating Virus of Japan Envelope (HVJ-E) Using a Layer-by-Layer Assembly Technique. *Langmuir* **2013**, 7384–7392.

(26) Uto, K.; Yamamoto, K.; Kishimoto, N.; Muraoka, M.; Aoyagi, T.; Yamashita, I. Electrostatic Adsorption of Ferritin, Proteins and Nanoparticle Conjugate onto the Surface of Polyelectrolyte Multilayers. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3876.

(27) Blumberg, B. M.; Giorgi, C.; Rose, K.; Kolakofsky, D. Sequence Determination of the Sendai Virus Fusion Protein Gene. *J. Gen. Virol.* **1985**, *66*, 317–331.

(28) Homma, M.; Shimizu, K.; Shimizu, Y. K.; Ishida, N. On the Study of Sendai Virus Hemolysis. *Virology* **1976**, *71*, 41–47.

(29) Lackey, C. A.; Murthy, N.; Press, O. W.; Tirrell, D. A.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. Hemolytic Activity of pH-Responsive Polymer-Streptavidin. **1999**, 401–405.

(30) Dallocchio, F.; Tomasi, M.; Bellini, T. Activation of the Sendai Virus Fusion Protein by Receptor Binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 36–41.

(31) Kaneda, Y.; Nakajima, T.; Nishikawa, T.; Yamamoto, S.; Ikegami, H.; Suzuki, N.; Nakamura, H.; Morishita, R.; Kotani, H. Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) Envelope Vector as a Versatile Gene Delivery System. *Mol. Ther.* **2002**, *6*, 219–226.

(32) Bullough, P. A.; Hughson, F. M.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. Structure of Influenza Haemagglutinin at the pH of Membrane Fusion. *Nature* **1994**, *371*, 37–43.

(33) Pizzato, M.; Blair, E. D.; Fling, M.; Kopf, J.; Tomassetti, a; Weiss, R. a; Takeuchi, Y. Evidence for Nonspecific Adsorption of Targeted Retrovirus Vector Particles to Cells. *Gene Ther.* **2001**, *8*, 1088–1096.

(34) Ai, H. Layer-by-Layer Capsules for Magnetic Resonance Imaging and Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 772–788.

(35) Ariga, K.; Lvov, Y. M.; Kawakami, K.; Ji, Q.; Hill, J. P. Layer-by-Layer Self-Assembled Shells for Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 762–771.

(36) Caruso, F.; Trau, D.; Möhwald, H.; Renneberg, R. Enzyme Encapsulation in Layer-by-Layer Engineered Polymer Multilayer Capsules. *Langmuir* **2000**, *16*, 1485–1488.

(37) Guillot, R.; Gilde, F.; Becquart, P.; Sailhan, F.; Lapeyrere, A.; Logeart-Avramoglou, D.; Picart, C. The Stability of BMP Loaded Polyelectrolyte Multilayer Coatings on Titanium. *Biomaterials* **2013**, *34*, 5737–5746.

(38) Neufurth, M.; Wang, X.; Schröder, H. C.; Feng, Q.; Diehl-Seifert, B.; Ziebart, T.; Steffen, R.; Wang, S.; Müller, W. E. G. Engineering a Morphogenetically Active Hydrogel for Bioprinting of Bioartificial Tissue Derived from Human Osteoblast-like SaOS-2 Cells. *Biomaterials* **2014**, *35*, 8810–8819.

(39) Nishiguchi, A.; Yoshida, H.; Matsusaki, M.; Akashi, M. Rapid Construction of Three-Dimensional Multilayered Tissues with Endothelial Tube Networks by the Cell-Accumulation Technique. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 3506-3510.

第 5 章

結言

本論文では、高分子化学と不活性化センダイウイルス (HVJ-E) という２つの「材料」を用いて、HVJ-E の機能化、ならびにそのバイオマテリアルへの応用に向けた知見を得ることに成功した。それぞれの章における研究成果を下記にまとめる。

第２章では、HVJ-E 上に Layer-by-Layer 法を用いて、HVJ-E 粒子の表面を修飾し、機能化させる技術開発についてまとめた。HVJ-E は腫瘍に対し、優れた抗腫瘍免疫効果を誘導できることから、HVJ-E を利用した免疫療法の実現が期待されている。しかし、HVJ-E の抗腫瘍効果を最大限発現させるためには HVJ-E の癌細胞への感染、すなわち癌部位へのデリバリー技術の開発が不可欠であった。HVJ-E は粒径が約 250 nm であることから、一般的なナノ粒子のデリバリーに用いられている EPR 効果を利用した受動的なデリバリーが実現できない為、腫瘍に対する能動的な標的能を HVJ-E に付与する必要があった。加えて、HVJ-E の赤血球との凝集作用や、通常細胞への吸着が HVJ-E を用いた効率的な癌治療法開発には障壁となっていた。そこで本研究においては、HVJ-E の表面を、ヒアルロン酸を含む高分子電解質薄膜により修飾することを考案した。ヒアルロン酸は腫瘍表面に過剰発現する CD44 レセプターと高い親和性を有していることから、癌細胞に優位にデリバリーできることが期待された。更に、高分子電解質膜で表面を覆うことで、赤血球や通常細胞といった HVJ-E レセプターを発現する癌細胞以外の細胞への吸着を抑制することが出来ると期待し、LbL 法を用いたヒアルロン酸修飾を行った。本研究では、LbL 法による HVJ-E 表面の修飾において、HVJ-E の粒子間凝集を生じない条件を見出し、更に HVJ-E の生体内における赤血球に対する溶血反応の減少を確認した。今後の展望として、LbL 法により高分子積層膜を修飾された HVJ-E の、積層膜間への薬物や磁性粒子の担持を実現することで、HVJ-E の抗癌作用のみではなく、キャリアとしての性質を飛躍的に向上させる技術となる。

第３章では、HVJ-E をナノファイバー表面に固定化し、生体内で所定時間徐放可能な HVJ-E 吸着ナノファイバーの開発についてまとめた。HVJ-E は単独で癌細胞に細胞死を誘導する能力を有するだけでなく、化学療法や放射線療法など、他治療法と組み合わせることにより、その治療効果を増大させることがこれまでの知見で明らかとなっていた。しかし、HVJ-E は生体内において、局所で所定時間滞留することが出来ず、拡散や赤血球との反応により、所定時間、癌組織に留まることはない。他治療法と組み合わせて HVJ-E を利用するために本研究では、HVJ-E を、LbL 法を利用し、ナノファイバー上に固定化する技術を開発した。本研究により作製した HVJ-E 徐放ナノファイバーは、癌細胞の成長を 72 時間抑制しただけでなく、細胞数を減少させることが確認された。この結果から、HVJ-E 徐放ナノファイバーの癌治療への有用性が示された。

ナノファイバーはその内部に磁性粒子や抗癌剤を内包させることが可能であることから、それらを内包させたナノファイバーを作製し、本開発技術と組み合わせることで、化学療法、温熱療法更には免疫療法を組み合わせた革新的な癌治療法の開発が実現可能となるであろう。

第４章では、HVJ-E の細胞表面シアル酸認識能を利用した、新規細胞分離方法の開発についてまとめた。細胞分離はこれまで、細胞の大きさや細胞の蛍光ラベル化、抗原抗体反応を利用した分離方法が開発されてきた。既存技術では高効率で目的細胞を回収できる一方で、利用できる細胞種が

限られる、表面設計が困難であるなど、その利用には制約があった。そこで、HVJ-E を利用した新規の細胞選別方法として、HVJ-E の細胞表面レセプターを選択的に認識し、吸着させる細胞選別手法を考案した。しかし、HVJ-E の基板への固定化方法や、表面の詳細な設計、および固定化 HVJ-E のタンパク質活性、細胞分離の知見などはこれまで得られていなかった。本研究により作製された HVJ-E 吸着基板は、HVJ-E の表面タンパク質の活性が基板固定化後も維持されていることを、溶血試験や細胞融合試験を通して確認した。また、表面に固定化された HVJ-E が、GD1a の発現細胞を優位に捕捉することが可能であることを見出した。更に、本技術をガラスチューブ内部に応用することで、2 種類の細胞混合液から、1 種類の細胞を選別することに成功した。本成果によって、再生医療における、分化後のヒト骨髄由来間葉系肝細胞 hBMSC の細胞分離や、GD1a を過剰発現する悪性腫瘍細胞の単離に応用が可能である。また、HVJ-E 表面のタンパク質の改変することで、GD1a 以外の細胞も回収することが可能となる。本技術の開発は再生医療における細胞分離に貢献できるであろう。

これまで、HVJ-E のような不活性化ウイルスは、ウイルスの有する性質を利用した、細胞の遺伝子組み換えや細胞へのタンパク質導入など、その利用方法は極めて限定されていた。「材料」として用いることで、これまで生物学的な手法により機能化されてきたウイルスが、より高度な性質を発現させることが可能となる。今後、高分子修飾法を用いて機能化された HVJ-E が、より機能化された「材料」として用いられ、再生医療・生物学会に重要な役割を果たすことを期待する。

発表リスト

本論文の成果は、下記学会・論文にて報告した。

【学術誌への掲載】

1) Takaharu Okada, Koichiro Uto, Masao Sasai, Chun Man Lee, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, “Nano-Decoration of the Hemagglutinating Virus of Japan Envelope (HVJ-E) Using a Layer-by-Layer Assembly Technique”. ***Langmuir*** 2013, 29, 7384-7392

2) Takaharu Okada, Koichiro Uto, Takao Aoyagi, Mitsuhiro Ebara. “A Biomimetic Approach to Hormone Resistant Prostate Cancer Cell Isolation Using Inactivated Sendai Virus (HVJ-E)”. ***Biomaterials Sciences*** 2016, 4, 96-103

3) Takaharu Okada, Eri Niiyama, Koichiro Uto, Takao Aoyagi, Mitsuhiro Ebara. “Inactivated Sendai Virus (HVJ-E) Immobilized Electrospun Nanofiber for Cancer Therapy”. ***Materials*** 2016. 9, 12-23.

【国際会議における発表】

1) ○Takaharu Okada, Koichiro Uto, Masao Sasai, Chun Man Lee, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, “Design of Hyaluronic Acid Functionalized HVJ-Envelope for Tumor-Targeting Using Layer-by-Layer Assembly Technique”, The 9th World Biomaterials Congress. Chengdu, CHINA, June, 2012. (口頭発表 査読有り)

2) Takaharu Okada, ○Koichiro Uto, Masao Sasai, Chun Man Lee, Atsuhiro Saito, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, “Hyaluronic acid-functionalized HVJ-Envelope as tumor targetable nanocarriers” Nano Bio Seattle 2012. Seattle, USA, July, 2012. (ポスター発表 査読有り)

3) ○Takaharu Okada, Koichiro Uto, Masao Sasai, Chun Man Lee, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, “Nano-Film Coating on the Envelope Type “Virus” Using Layer-by-Layer Assembly Technique” 1st International Workshop on Nano and Microstructure Design (IWNMD 2012). Tsukuba, Japan, December, 2012. (口頭発表

査読無し)

4) ○Takaharu Okada, Koichiro Uto, Masao Sasai, Chun Man Lee, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, "Development of Hyaluronic Acid Modified Inactivated Virus Vector for Cancer Treatment" 2nd International Conference on Biomaterials Science. (ICBS2013), Tsukuba, Japan, March 19-22, 2013. (ポスター発表　査読有り)

5) ○Takaharu Okada, Koichiro Uto, Masao Sasai, Chun Man Lee, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, "Hyaluronic acid modification of inactivated Hemagglutinating virus of Japan and examination of its viral activity", Tsukuba Nanotechnology Symposium 2013, Tsukuba, Japan, July 26-27, 2013. (ポスター発表　査読無し)

6) ○Takaharu Okada, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, "Design of an inactivated Sendai virus immobilized film for the construction of a bioactive surface" 12th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials. Auckland, New Zealand, December 8-13, 2013. (口頭&ポスター発表　査読有り)

7) ○Takaharu Okada, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, "Design of an inactivated Sendai virus immobilized film for the construction of a bioactive surface" Layer-by-Layer (LbL) Assemblies: Science and Technology Conference, New Jersey, United States, June 23-25, 2014. (ポスター発表　査読なし)

8) ○Takaharu Okada, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, "Inactivated Sendai Virus Immobilized Film for Creating a Bioactive Surface" NIMS Conference 2014, Tsukuba, Japan, July 1-3, 2014. (ポスター発表　査読なし)

9) ○Takaharu Okada, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, "Development and Characterization of Inactivated Virus Immobilized Surface" Tsukuba Nanotechnology Symposium 2014, Tsukuba, Japan, July 24-25, 2014. (口頭&ポスター発表　査読なし)

10) ○ Takaharu Okada, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, Immobilization of Inactivated Sendai Virus via Layer-by-Layer Assembly for Cell Separation. MANA symposium 2015, Tsukuba, Japan, March 13-16, 2015. (口頭&ポスター発表 査読なし)

11) ○Takaharu Okada, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Takao Aoyagi, Immobilization of Inactivated Sendai Virus via Layer-by-Layer Assembly for Cell Separation. 3rd Hoffman Family symposium 2015, Gwangju, Korea, March 19-20, 2015 (ポスター発表 査読なし).

12) ○Takaharu Okada, Koichiro Uto, Takao Aoyagi, Mitsuhiro Ebara, Studies on functionalization of Hemagglutinating Virus of Japan Envelope (HVJ-) with layer-by-layer assembly technique. Pacifichem 2015. Honolulu, Hawaii, December 15-20, 2015 (ポスター発表 査読有り).

13) ○Takaharu Okada, Eri Niiyama, Mitsuhiro Ebara. MANA symposium 2016. Tsukuba, Ibaraki, Japan, March 9-11, 2016 (ポスター発表予定 査読なし)

【国内学会・シンポジウムにおける発表】

1) ○岡田孝春、宇都甲一郎、笹井雅夫、李千萬、荏原充宏、青柳隆夫、“CD44 ターゲッティングを目指した LBL 法による HVJ-E ベクター表面へのヒアルロン酸のコーティング”第 60 回 高分子討論会, 2011 年 9 月 岡山（口頭発表）

2) ○岡田孝春、宇都甲一郎、笹井雅夫、李千萬、荏原充宏、青柳隆夫、”新規の癌治療法開発に向けた HVJ-E の機能化” つくば医工連携フォーラム 2012, 2012 年 1 月 つくば (ポスター発表)

3) ○岡田孝春、宇都甲一郎、笹井雅夫、李千萬、荏原充宏、青柳隆夫、“CD44 ターゲティングを目指した HVJ-E ベクター表面へのヒアルロン酸コーティング”第 61 回 高分子学会年次大会, 2012 年 5 月 横浜 （ポスター発表）

4) 〇岡田孝春、宇都甲一郎、笹井雅夫、李千萬、荏原充宏、青柳隆夫、”不活性化センダイウイルス機能化のための高分子集積法の開発” バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012, 2012 年 11 月 仙台 (ポスター発表)

5) 〇岡田孝春、宇都甲一郎、笹井雅夫、李千萬、荏原充宏、青柳隆夫、”不活性化センダイウイルス機能化のための高分子集積法の開発” バイオマテリアル学会 若手会 関東支部会, 2012 年 11 月 東京 (ポスター発表)

6) 〇岡田孝春、宇都甲一郎、笹井雅夫、李千萬、荏原充宏、青柳隆夫、”不活性化センダイウイルス (HVJ-E) 機能化のための LbL 法を用いた高分子集積法の開発” インテリジェント材料シンポジウム 2013 年 1 月 東京 (口頭発表)

7) 〇岡田孝春、宇都甲一郎、笹井雅夫、李千萬、荏原充宏、青柳隆夫、”効率的な癌治療を目指した不活性化ウイルス表面への高分子集積方法の開発” つくば医工連携フォーラム 2013, 2013 年 1 月 つくば (ポスター発表)

8) 〇岡田孝春、宇都甲一郎、笹井雅夫、李千萬、荏原充宏、青柳隆夫、“不活性化センダイウイルス (HVJ-E) 表面へのヒアルロン酸を用いた LbL 膜の積層とその機能評価” 第 62 回高分子学会年次大会, 2013 年 5 月 京都 (口頭発表)

9) 〇岡田孝春、宇都甲一郎、荏原充宏、青柳隆夫、”不活性化センダイウイルスを表面に集積させたウイルス模倣表面の設計” 第 62 回高分子討論会, 2013 年 9 月, 金沢 (口頭発表)

10) 〇岡田孝春、宇都甲一郎、荏原充宏、青柳隆夫、”不活化ウイルス集積表面の設計” ゲルワークショップ イン 加賀, 2013 年 9 月, 金沢 (ポスター発表)

11) 〇岡田孝春、宇都甲一郎、荏原光宏、青柳隆夫、” 不活性化センダイウイルス吸着表面の作製と細胞分離への応用” 2015 年 1 月 23 日, 医工連携フォーラム 2015, つくば（ポスター発表）

12) ○岡田孝春、宇都甲一郎、荏原光宏、青柳隆夫、”細胞分離技術の開発を指向した不活性化センダイウイルス吸着表面の作製” 2015 年 3 月 6 日，第１０回つくばナノテク拠点シンポジウム，つくば (ポスター発表)

13) ○岡田孝春、宇都甲一郎、青柳隆夫、荏原充宏,”高分子電解質膜上に束縛されたウイルスの膜タンパク質の活性評価とレセプター依存的な細胞認識機能”2015 年 5 月，札幌、第 64 回 高分子年次大会（ポスター発表）

14) ○岡田孝春、宇都甲一郎、青柳隆夫、荏原充宏,”不活性化センダイウイルス (HVJ-E) の細胞認識機能を利用した細胞分離方法の開発” 2015 年 11 月，第 37 回日本バイオマテリアル学会，京都 (口頭発表)

【受賞歴等】

1) Takaharu Okada. “Excellent Presentation Award” (IWNMD 2012), December, 2012.

2) Takaharu Okada. “Acta Biomaterialia Poster Award” (ICBS 2013), March, 2013.

3) Takaharu Okada. “Travel Award” (ICBS2013), March, 2013.

4) 岡田孝春. “修士論文発表優秀賞” （筑波大学大学院）, 2013 年 3 月

5) 岡田孝春. “筑波大学オナーズプログラム 採用”, 2013 年 4 月

6) Takaharu Okada. “Excellent Presentation Award” (NIMS student seminar), 2014 年 2 月

7) 岡田孝春. “日本学術振興会特別研究員 DC2 採用”, 2014 年 4 月

8) 岡田孝春. “研究奨励賞” (つくば医工連携フォーラム 2015), 2015 年 1 月

【その他】

2014 年 1 月 25 日~2014 年 5 月 24 日　フランス グルノーブル工科大学 Grenoble INP / MINATEC Catherine Picart 教授の研究室へ留学

【謝辞】

本研究を行うにあたり、終始懇切丁寧なるご指導、ご鞭撻を賜りました筑波大学大学院数理物質科学研究科 竹内正之 教授、日本大学理工学部 青柳隆夫 教授に心よりの感謝の意を表します。

本論文の執筆にあたり、ご指導、ご助言を賜りました筑波大学大学院 数理物質科学研究科 三木一司 教授、内藤昌信 准教授、辻村清也 准教授に深く感謝いたします。

本実験の進行・ディスカッションに於いて、丁寧なご指導、ご助言を賜りました国立研究開発法人 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 荏原充宏 ＭＡＮＡ研究者、日本学術振興会 海外特別研究員 宇都甲一郎 博士に深く感謝いたします。

本論文第２章において、実験の進行・議論において終始丁寧なご指導を賜りました大阪大学付属病院 未来医療センター 李千萬 准教授、笹井雅夫 博士に深く感謝いたします。また、電子顕微鏡の撮影にご助力頂きました国立研究開発法人 物質・材料研究機構 電子顕微鏡ステーションの倉嶋敬次 氏に感謝致します。

本論文第３章において、共焦点顕微鏡の撮影にご助力頂きました国立研究開発法人 物質・材料研究機構 ナノテクノロジープラットフォームの 永野麗子 博士に深く感謝致します。レーザー電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡の撮影にご助力頂きました、国立研究開発法人 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点の 飯山 清高 氏に深く感謝致します。

本論文第４章において、吸光プレートリーダーおよび接触角測定装置の使用に関して、便宜を払っていただきました、国立研究開発法人 物質・材料研究機構 陳国平 教授、田口哲志 准教授に深く感謝致します。

つくばナノテク拠点産学独連携人材育成プログラム（オナーズプログラム）において、連携コーディネータとして本研究をサポートしていただいた 堀池靖浩 博士、北島正弘 博士、浅川潔 博士に深く感謝致します。2014 年 1 月～5 月まで LbL 法を用いた表面修飾、およびその Biology への応用に関する研究をさせていただいた、グルノーブル工科大学の Catherine Picart 教授、Flora Gilde 博士、Catherine 研究室の皆様に深く感謝致します。また、資金面・生活面の両方で留学生活をサポートしていただいたオナーズプログラム、運営委員の先生方、事務員の 鈴木波子 氏、オナーズプログラム事務局の皆様に深く感謝致します。

本研究の進行にあたり、日々の生活を支えていただいた物質・材料研究機構の小土橋 陽平 博士、Sharmy Mano Saimon 博士、Giancarlo Forte 博士、Stephania Pagliari 博士、井戸田直和 博士、Techawanitchai Prapatoson 博士、Young-Jin Kim 博士、Sara Romanazzo 博士、Ewelina Zawazak 博士、Monika Bill 博士、Janice Tam Kalvan 博士、滑川亘希 博士、Lin Weichih 博士、Xu Baijao 博士、Shou Qinghui 博士、佐藤健 氏、中川泰宏 氏、栗本理央 氏、新山瑛理 氏、高井僚 氏、野村奈生人 氏、

荏原愛 博士、廣山昌子 氏、佐伯純子 氏、金田尚子 氏、笠谷しいな氏、野尻希和氏、飛鷹房子 氏、松本美友希 氏に深く感謝致します。

博士課程在学中にアウトリーチ活動にてお世話になった、物質・材料研究機構　ＭＡＮＡアウトリーチチームの葉山雅 氏、アウトリーチチームのメンバーの方に感謝致します。

本研究は、ＮＩＭＳジュニア研究員として、また、日本学術振興会 特別研究員 (科研費 特別研究員奨励費 26・4086) として遂行されたものであり、ここに感謝の意を示します。

最後に、日頃から温かく見守り、支えて頂いた家族、道哉、良子、綾子、奈穂美に心より感謝致します。